



Cancer du sein pendant la grossesse : interactions des taxanes avec le trophoblaste humain par une approche ex vivo et in vitro

Paul Berveiller

► To cite this version:

Paul Berveiller. Cancer du sein pendant la grossesse : interactions des taxanes avec le trophoblaste humain par une approche ex vivo et in vitro. Cancer. Université René Descartes - Paris V, 2014. Français. NNT : 2014PA05T029 . tel-01165040

HAL Id: tel-01165040

<https://theses.hal.science/tel-01165040>

Submitted on 18 Jun 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ PARIS DESCARTES

Spécialité : Développement

Ecole doctorale de rattachement : Gc2ID

Présentée par

Paul BERVEILLER

Le 6 Mai 2014

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ PARIS DESCARTES

Cancer du sein pendant la grossesse :

Interactions des taxanes avec le trophoblaste humain par une approche *ex vivo* et *in vitro*.

Directeur de thèse : Dr. Danièle EVAIN-BRION

JURY

Monsieur le Professeur Vassilis TSATSARIS

Président

Madame le Docteur Nadia ALFAIDY

Rapporteur

Monsieur le Professeur Olivier FARDEL

Rapporteur

Madame le Docteur Danièle EVAIN-BRION

Examineur

Madame le Professeur Sophie GIL

Examineur

Monsieur le Professeur Bruno CARBONNE

Examineur

Remerciements

A Madame le Dr. Danièle Evain-Brion, directrice de l'Unité INSERM 767, et directrice de ce travail, de m'avoir si gentiment accueilli au sein de son unité et de m'avoir permis de réaliser ce travail dans les meilleures conditions possibles. Je vous remercie infiniment d'avoir guidé si subtilement mon travail.

A Monsieur le Pr. Vassilis Tsatsaris, d'avoir accepté de présider cette Thèse de Sciences. Tous vos conseils, votre disponibilité exceptionnelle, votre constante gentillesse font de vous un réel exemple à suivre, dont je m'efforce chaque jour d'être digne.

A Madame le Dr. Nadia Alfaïdy et à Monsieur le Pr. Olivier Fardel, d'avoir accepté d'être rapporteurs de cette Thèse de Sciences et d'y avoir prêté autant de temps et d'attention.

A Madame le Pr. Sophie Gil, de m'avoir supervisé depuis le début de ce cursus scientifique, avec une disponibilité constante, une gentillesse à toute épreuve et une particulière sensibilité. Vous m'avez transmis votre passion de la thématique du « médicament pendant la grossesse », et je vous en remercie infiniment.

A Monsieur le Pr. Bruno Carbonne, qui a si gentiment accepté cette invitation pour être examinateur. De par vos conseils depuis le début de mon cursus médical, votre savoir et votre réussite, vous êtes un modèle de médecin auquel j'aimerais ressembler.

A tous les membres de l'Unité INSERM 767, avec une mention toute particulière à Pascale Gerbaud, Guillaume Pidoux, Nadine Segond, Fatima Ferreira qui m'ont appris les rudiments de la Science Fondamentale. Je leur dois cette Thèse de Sciences. A Christelle Simasotchi, qui m'a montré ce que voulait dire le terme « efficacité »... Merci !

A Sarah Berndt, pour son dynamisme, ses conseils et son amitié simplement.

A Mélanie Cocquebert, d'avoir passé cette étape avant moi et de m'avoir toujours conseillé parfaitement.

A Alicia Grosso, pour sa sympathie, sa disponibilité et sa (quasi)-constante bonne humeur.

A Josette Badet, pour son incommensurable savoir et sa constance, à Thierry Fournier pour nos discussions dont les thématiques étaient aussi diverses qu'animées, à Françoise Aucouturier sans qui aucune expérimentation ne serait réellement possible. Enfin à Audrey Chissey, d'avoir su et bien voulu m'inculquer les bases, et ce dès le départ de mon cursus de recherche. Merci à toi !

A mes ami(e)s les plus cher(e)s:

Jean-Patrick Le Meaux et Jean-Marie Malaret, mes deux premiers exemples d'Obstétriciens,

Olivier Mir, sans qui rien ne serait arrivé. Je lui dois beaucoup, beaucoup... Je lui en serai éternellement reconnaissant,

Toute l' « Alésia Connection » : mon Instructeur Mathieu Tastard, mon PNC préféré Anthony Clément, Mathieu Ferrand, Julie Lohard, Anaïs Boilly, Amanda Cox, Nathalie Suprano.

Emmanuel Bailly, Anne-Laure Margulies,

Olivier Morel, Nicolas Veyrie, Jérôme Naudin, Elisabeth Chéreau, Martin Koskas,

A Alix Defline qui m'a si gentiment repris des gardes pour me libérer du temps,

A Juliette, Patricia, Michèle, Camille et Marie,

A ma belle-famille, Catherine, Vincent, Charlotte, Edouard, Etienne, Marie-Agnès, Claude,

A ma famille, Christelle Humbert, Gaïa Lequindre, Fantic et Claudine Berveiller, Martine Roland-Manuel, Jean-François et Jocelyne Angst,

Aux Professeurs Edouard et Henri-Edouard Brissaud, en espérant qu'ils seront fiers de moi, de là où ils sont,

A Marie-Josée et Pierre-Yves Berveiller, mes parents adorés, qui m'ont toujours encouragé et se sont sacrifiés pour me donner ce qu'il y a de meilleur,

A mon épouse aimée, Marine, pour son soutien permanent, sa patience, son écoute, sa tendresse, ses avis toujours précieux, sa complicité et son amour,

A Henri, mon fils adoré.

« A quoi sert la vie si les enfants n'en font pas plus que leurs pères ? » Gustave Courbet

« La théorie, c'est quand on sait tout et que rien ne fonctionne. La pratique, c'est quand tout fonctionne et que personne ne sait pourquoi. Ici, nous avons réuni théorie et pratique : rien ne fonctionne... et personne ne sait pourquoi » Albert Einstein

« Le succès, c'est aller d'échec en échec, sans jamais perdre son enthousiasme. » Winston Churchill

Table des matières

REMERCIEMENTS.....	1
TABLE DES MATIERES.....	3
LISTE DES ABREVIATIONS	8
LISTE DES FIGURES	12
LISTE DES TABLEAUX.....	15
INTRODUCTION	16
I - LE PLACENTA HUMAIN	18
A. LE DEVELOPPEMENT DU PLACENTA HUMAIN	18
<i>Stade prélacunaire.....</i>	<i>19</i>
<i>Stade lacunaire.....</i>	<i>20</i>
<i>Stade villex.....</i>	<i>21</i>
<i>Le trophoblaste villex et les villosités flottantes.....</i>	<i>22</i>
<i>Les CT extravillex et la villosité crampon.....</i>	<i>23</i>
<i>La mise en place de la circulation fœtale.....</i>	<i>24</i>
<i>La vascularisation utéro-placentaire</i>	<i>25</i>
B. LE TROPHOBLASTE VILLEUX ET LA BARRIERE PLACENTAIRE	28
II - LE PASSAGE TRANSPLACENTAIRE DES MEDICAMENTS	30
A. LES DETERMINANTS DU PASSAGE TRANSPLACENTAIRE	30
1. <i>La diffusion passive.....</i>	<i>30</i>
2. <i>La diffusion facilitée</i>	<i>33</i>
3. <i>Le transport actif.....</i>	<i>33</i>
B. LES DIFFERENTS MODELES D'ETUDE DU PASSAGE TRANSPLACENTAIRE DES MEDICAMENTS	

1. <i>Modèle du cotylédon placentaire perfusé</i>	35
2. <i>Modèle des lignées cellulaires cancéreuses</i>	37
3. <i>Modèle de culture primaire de trophoblastes humains</i>	38
4. <i>Explants villositaires</i>	39
5. <i>Fractions cellulaires</i>	40
C. LES TRANSPORTEURS PLACENTAIRES – REVUE DE LA LITTÉRATURE	41
1- <i>Les transporteurs « Solute Carrier » - SLC (Tableau 2)</i>	41
Organic anion-transporting polypeptides (OATP)	41
Organic anion transporters (OAT)	43
Organic cation transporters (OCT)	44
Les monoamines transporters (MAT)	45
Les transporteurs d'acides aminés	46
Les monocarboxylate transporters (MCT)	47
Les transporteurs de glucose	48
Les peptide transporters (PT)	49
Concentrative nucleoside transporters (CNT)	50
Equilibrative nucleoside transporters (ENT)	51
2- <i>Les transporteurs ATP-binding Cassette (ABC) (Tableau 3)</i>	61
ABCB1/MDR1, P-glycoprotein (P-gp)	61
ABCB4/MDR3	62
ABCC1/MRP (multidrug resistance-associated protein)1	63
ABCC2-3/MRP2-3	63
ABCC4-5/MRP5-5	64
ABCC6-10-12/MRP6-7-9	64
ABCG2/BCRP	65
TAP (transporter associated with antigen processing)/ABCB2-ABCB3	66
ABCF1/ABC50	66
3- <i>Autres familles de transporteurs</i>	73
Aquaporines (AQP)	73

Les ATPases de transport du cuivre.....	73
Major vault protein (MVP) – Lung resistance-related protein (LRP).....	74
VDAC1 (Voltage-dependent anion-selective channel protein 1).....	74
III – CANCER DU SEIN DURANT LA GROSSESSE ET PASSAGE	
TRANSPLACENTAIRE DES TAXANES ET AUTRES AGENTS ANTICANCEREUX.....	76
A- CANCER DU SEIN DURANT LA GROSSESSE.	76
B- LES TAXANES: HISTORIQUE, STRUCTURE CHIMIQUE, PROPRIETES PHARMACOLOGIQUES ET MODE D’ACTION.....	78
C- PASSAGE TRANSPLACENTAIRE DES TAXANES.....	85
D- PASSAGE TRANSPLACENTAIRE DES AUTRES AGENTS ANTICANCEREUX	87
OBJECTIFS DE L’ETUDE	89
MATERIEL ET METHODES	90
1- LE MODELE DU COTYLEDON PLACENTAIRE HUMAIN PERFUSE.....	90
<i>Matériels et réactifs.....</i>	<i>90</i>
<i>Méthode</i>	<i>92</i>
2- LA CULTURE PRIMAIRE DE TROPHOBLASTES.....	96
3- LES MARQUEURS DE FUSION CELLULAIRE ET DE FORMATION DU ST.....	98
4- ETUDE DE L’EXPRESSION GENIQUE DES DIFFERENTS TRANSPORTEURS DE MEDICAMENT	100
<i>Réalisation des culots en vue de l’étude transcriptionnelle</i>	<i>100</i>
<i>Extraction des ARN.....</i>	<i>100</i>
<i>Dosage des ARN – Vérification de l’absence de dégradation</i>	<i>101</i>
<i>Réalisation de la PCR (Polymerase Chain Reaction) en temps réel (Fig. 28).....</i>	<i>102</i>
5- ETUDE DE L’EXPRESSION PROTEIQUE DES DIFFERENTS TRANSPORTEURS PLACENTAIRES EN FONCTION DU TERME DE LA GROSSESSE, SUR UN MODELE DE CULTURE PRIMAIRE DE TROPHOBLASTES	103
<i>Récupération des culots cellulaires</i>	<i>103</i>

<i>Extraction protéique.....</i>	<i>104</i>
<i>Réalisation des western blots.....</i>	<i>104</i>
ARTICLE 1	106
UTILISATION DE LA METHODE DE CULTURE PRIMAIRE DE TROPHOBLASTES HUMAINS AFIN D'ETUDIER L'EXPRESSION DES TRANSPORTEURS PLACENTAIRES AU COURS DE LA GROSSESSE.....	
	106
ARTICLE 2	149
ETUDE COMPARATIVE DU PASSAGE TRANSPLACENTAIRE DES TAXANES AVEC UTILISATION DU MODELE DE COTYLEDON PLACENTAIRE PERFUSE.....	
	149
ARTICLE 3	158
EVALUATION DES REPERCUSSIONS PLACENTAIRES APRES EXPOSITION AUX TAXANES PAR UNE ASSOCIATION DE MODELES EXPERIMENTAUX IN VIVO, EX VIVO ET IN VITRO	
	158
PASSAGE TRANSPLACENTAIRE IN VIVO DU PACLITAXEL SUR DES COTYLEDONS DE FEMME ENCEINTES TRAITEES PAR PACLITAXEL DURANT LEUR GROSSESSE POUR UN CANCER DU SEIN	
	159
PASSAGE TRANSPLACENTAIRE EX VIVO DU PACLITAXEL ET SON ACCUMULATION COTYLEDONAIRE	
	161
EFFETS IN VITRO DU PACLITAXEL SUR DES CULTURES PRIMAIRES DE TROPHOBLASTES HUMAINS ISSUS DE PLACENTAS A TERME	
	161
EFFETS IN VITRO DU PACLITAXEL SUR L'EXPRESSION PROTEIQUE DE DEUX TRANSPORTEURS PLACENTAIRES MAJEURS (P-GP ET BCRP) A PARTIR DE CULTURES PRIMAIRES DE TROPHOBLASTES HUMAINS ISSUS DE PLACENTAS A TERME	
	162
EFFETS IN VITRO DU PACLITAXEL SUR L'EXPRESSION GENIQUE DES TRANSPORTEURS PLACENTAIRES ABC ET SLC A PARTIR DE CULTURES PRIMAIRES DE TROPHOBLASTES HUMAINS ISSUS DE PLACENTAS A TERME	
	162

PASSAGE TRANSPLACENTAIRE IN VIVO DU PACLITAXEL SUR DES COTYLEDONS DE FEMMES ENCEINTES TRAITEES PAR PACLITAXEL DURANT LEUR GROSSESSE POUR UN CANCER DU SEIN	162
PASSAGE TRANSPLACENTAIRE EX VIVO DU PACLITAXEL ET SON ACCUMULATION COTYLEDONAIRE	165
EFFETS IN VITRO DU PACLITAXEL SUR DES CULTURES PRIMAIRES DE TROPHOBLASTES HUMAINS ISSUS DE PLACENTAS A TERME	165
EFFETS IN VITRO ET IN VIVO DU PACLITAXEL SUR L'EXPRESSION PROTEIQUE DE DEUX TRANSPORTEURS PLACENTAIRES MAJEURS (P-GP ET BCRP) A PARTIR DE CULTURES PRIMAIRES DE TROPHOBLASTES HUMAINS ISSUS DE PLACENTAS A TERME ET DE COTYLEDONS DE PATIENTES TRAITEES PAR PACLITAXEL DURANT LA GROSSESSE.....	167
EFFETS IN VITRO DU PACLITAXEL SUR L'EXPRESSION GENIQUE DES TRANSPORTEURS PLACENTAIRES ABC ET SLC A PARTIR DE CULTURES PRIMAIRES DE TROPHOBLASTES HUMAINS ISSUS DE PLACENTAS A TERME	169
DISCUSSION ET CONCLUSION	170
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	173
CONCLUSION	181
PUBLICATIONS ADDITIONNELLES	182
1- BERVEILLER ET AL. AM J OBSTET GYNECOL. 2012 JAN;206(1):92.E1-6.	182
2- BERVEILLER ET AL. ANTICANCER DRUGS. 2012 AUG;23(7):754-7.....	188
3- MIR O, BERVEILLER P. LANCET ONCOL. 2012 SEP;13(9):852-4.....	192
LISTE DES PUBLICATIONS ET DES COMMUNICATIONS	194
PUBLICATIONS INTERNATIONALES DEPUIS 2010	194
COMMUNICATIONS ORALES OU POSTERS DEPUIS 2010	195
REFERENCES	197

Liste des abréviations

10-DAB : 10-désacétylbaccatine III

ABC : *ATP binding cassette*

ADNc : acide désoxyribonucléique complémentaire

ADNg : acide désoxyribonucléique génomique

AQP : aquaporine

ARN : acide ribonucléique

ARNm: acide ribonucléique messenger

ARNt : acide ribonucléique de transfert

ATP : adénosine triphosphate

BCRP : *breast cancer resistance protein*

BET : bromure d'éthidium

CALG : groupe de travail « cancers associés à la grossesse »

CK7 : cytokératine 7

C_{max} : concentration maximale

CNT : *concentrative nucleoside transporters*

CT : cytotrophoblaste

CTEV : cytotrophoblaste extravilleux

CT1 : *Copper transporter 1*

Da : *Dalton*

DAPI : 4',6'-diamidino-2-phénylindole

DAT: *Dopamine transporter*

DMEN : *Dulbecco's modified Eagle medium*

DO : densité optique

EDTA : acide éthylène diamine tétraacétique

ENT: *equilibrative nucleoside transporters*

GLUT : *GLUcose Transporter*

GTP : guanosine triphosphate

HBSS : *Hank's balanced salt solution*

hCG : *human chorionic gonadotropin hormone*

HLA: *Human Leukocyte antigen*

hPL: *human placental lactogen hormone*

HPLC-UV: *high performance liquid chromatography* avec détecteur ultraviolet

IC : indice de clearance

LC-MS : *liquid chromatography – mass spectrometry*

LD : *lethal dose, 50%*

MAT : *monoamine transporters*

MCT : *monocarboxylate transporters*

MDR : *multi drug resistance*

MNK : Menkes

MRP : *multidrug resistance-associated protein*

MSS : milieu sans sérum

MXR : *mitoxantrone resistance protein*

NET : *norepinephrin transporter*

OATP : *organic anion-transporting polypeptides*

OAT : *organic anion transporters*

OCT : *organic cation transporters*

PCR : *polymerase chain reaction*

PCX : paclitaxel

P-gp : *P-glycoprotein*

PT : *peptide transporters*

QSP : quantité suffisante pour

RCIU : retard de croissance *in utero*

rpm : rotation par minute

SA : semaine d'aménorrhée

SDS : sodium dodecyl sulfate

SERT : *serotonin transporter*

SLC : *solute carrier*

SOAT : *sodium dependent organic anion transporter*

ST : syncytiotrophoblaste

TAP : *transporter associated with antigen processing*

TBE : tris borate EDTA

TEA : triéthanolamine

TTF : taux de transfert fœtal

VDAC1 : *voltage-dependent anion-selective channel protein 1*

VEGF-A : *vascular endothelial growth factor-A*

WND : Wilson

Liste des figures

FIGURE 1: EPIDEMIOLOGIE DES CANCERS TOUCHANT LES FEMMES ENCEINTES (DONNEES CALG – 2009).	16
FIGURE 2: LE PLACENTA HUMAIN (BENIRSCHKE ET AL. PATHOLOGY OF THE HUMAN PLACENTA – 5 TH ED – P.40).	18
FIGURE 3: REPRESENTATION SCHEMATIQUE D’UNE COUPE PLACENTAIRE TRANSVERSALE (D’APRES THE MC GRAW-HILL COMPANIES, 1997).....	19
FIGURE 4: REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES DIFFERENTES ETAPES DU DEVELOPPEMENT DU PLACENTA HUMAIN (ILLUSTRATIONS : PH. PLATEAUX).	20
FIGURE 5: REPRESENTATION SCHEMATIQUE D’UNE COUPE LONGITUDINALE VILLOSITE CHORIALE DE PLACENTA HUMAIN (D’APRES DANIELE EVAIN-BRION, ED.. LAVOISIER, 2010, P.45).....	21
FIGURE 6: REPRESENTATION SCHEMATIQUE D’UNE COUPE DE VILLOSITE ET DE LA “BARRIERE PLACENTAIRE” (DOUBLE FLECHE) (ILLUSTRATIONS: PH. PLATEAUX).....	22
FIGURE 7: VUE MACROSCOPIQUE DES DEUX FACES D’UN PLACENTA HUMAIN (PHOTO - ALY ABBARA).	25
FIGURE 8: A: RECONSTRUCTION SCHEMATIQUE FAITE A PARTIR DE COUPES SERIEES D’UNE ARTERE SPIRALEE TRAVERSANT LE MYOMETRE (M) PUIS L’ENDOMETRE (E) AVANT DE S’OUVRIR DANS LA CHAMBRE INTERVILLEUSE – B : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA VASCULARISATION UTERINE ET PLACENTAIRE DANS DIFFERENTES CONDITIONS (D’APRES BURTON ET AL. 2009).....	27
FIGURE 9: COUPE D’UNE VILLOSITE CHORIALE – MISE EN EVIDENCE DE LA “BARRIERE » PLACENTAIRE (DOUBLE FLECHE BLANCHE) – ILLUSTRATIONS : PH. PLATEAUX.....	29
FIGURE 10: SCHEMA DE CERTAINS TRANSPORTEURS ACTIFS DE MEDICAMENTS RETROUVE AU NIVEAU DU SYNCYTOTROPHOBLASTE HUMAIN (BCRP : BREAST CANCER RESISTANCE PROTEIN ; MDR : MULTI-DRUG RESISTANCE ; MRP : MULTI-DRUG-ASSOCIATED RESISTANCE PROTEIN).....	34
FIGURE 11: STRUCTURE CHIMIQUE DU PACLITAXEL.....	79
FIGURE 12: REPRESENTATION EN 3 DIMENSIONS DE LA MOLECULE DE PACLITAXEL (EXTRAIT DE COMMONS.WIKIMEDIA.ORG – 2013).....	79
FIGURE 13: STRUCTURE CHIMIQUE DU DOCETAXEL.....	80
FIGURE 14: REPRESENTATION EN 3 DIMENSIONS DE LA MOLECULE DE DOCETAXEL (EXTRAIT DE	

COMMONS.WIKIMEDIA.ORG – 2013).....	81
FIGURE 15: SQUELETTE DES TAXANES (D'APRES R. AOUZAL. 2010).	81
FIGURE 16: REPRESENTATION DU GROUPE 1 DES TAXANES ET DE LA TAXINE B (D'APRES R. AOUZAL. 2010).	82
FIGURE 17: REPRESENTATION DU GROUPE B DES TAXANES ET DE LA BACCATINE I (D'APRES R. AOUZAL. 2010).	82
FIGURE 18: REPRESENTATION DU GROUPE C DES TAXANES ET DU 10-DAB (D'APRES R. AOUZAL. 2010).	83
FIGURE 19: REPRESENTATION DU GROUPE D DES TAXANES ET DE LA TAXINE A (D'APRES R. AOUZAL. 2010).	83
FIGURE 20: REPRESENTATION DE LA STRUCTURE DES MICROTUBULES (D'APRES R. AOUZAL. 2010).	85
FIGURE 21: PHOTOGRAPHIES DES DIFFERENTS ELEMENTS DE LA CHAINE DE PERFUSION PLACENTAIRE.	91
FIGURE 22: SCHEMA DE MONTAGE EXPERIMENTAL DU MODELE EX VIVO DE PERFUSION DE COTYLEDON PLACENTAIRE D'APRES SCHNEIDER(SCHNEIDER, PANIGEL, AND DANCIS 1972).....	93
FIGURE 23: PHOTOGRAPHIES REALISEES LORS D'UNE PROCEDURE DE PERFUSION PLACENTAIRE.	94
FIGURE 24: REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE L'EVOLUTION MORPHOLOGIQUE DES CT.	98
FIGURE 25: VUE MICROSCOPIQUE ET IMMUNOCYTOCHIMIE REALISEE SUR UNE CULTURE PRIMAIRE DE TROPHOBLASTES (ISSUS DE CESARIENNE) MONTRANT LE PHENOMENE DE FUSION ENTRE 24 HEURES DE CULTURE (A ET C) ET 72 HEURES DE CULTURE A DROITE (B ET D). (4',6'-DIAMIDINO-2-PHENYLNDOLE (DAPI) EN BLEU ET ANTI-DESMOPLAKINE EN ROUGE).	99
FIGURE 26: EVOLUTION DU TAUX D'HCG PRELEVES DANS LE MILIEU DE CULTURE DE CT (ISSUS DE CESARIENNE A TERME).	99
FIGURE 27: EXEMPLE D'ELECTROPHORESE D'ARN MONTRANT NOTAMMENT LA SOUS-UNITE 28S ET LA SOUS- UNITE 18S.....	101
FIGURE 28: FIGURE RESUMANT LES DIFFERENTES ETAPES DE L'UTILISATION DES PLAQUES DE PCR. (SABIOSCIENCES®).....	103
FIGURE 29: EVOLUTION DU TAUX DE TRANSFERT FŒTAL DE PACLITAXEL (TTF, %) EN FONCTION DE LA DUREE DE PERFUSION.	165
FIGURE 30: GRAPHIQUE REPRESENTANT LA SURVIE TROPHOBLASTIQUE APRES 24H D'INCUBATION AVEC DIFFERENTES CONCENTRATIONS DE PACLITAXEL (LD 50 EN ROUGE).....	166
FIGURE 31: GRAPHIQUE (GAUCHE) REPRESENTANT LA SECRETION D'HCG DANS DES CULTURES DE TROPHOBLASTES TEMOINS ET DANS DES CULTURES EXPOSEES AU PACLITAXEL A LA DOSE DE $C_{MAX}/1000$.	

GRAPHIQUE (DROITE) REPRESENTANT L'INDEX DE FUSION A 48H DE CT EN CULTURE "TEMOINS" ET DE CT EXPOSES AU PACLITAXEL A $C_{MAX}/1000$	167
FIGURE 32: EXPRESSION PROTEIQUE DE P-GP ET BCRP DANS LES COTYLEDONS DE PATIENTS TRAITEES PAR PACLITAXEL DURANT LA GROSSESSE ET DANS DES COTYLEDONS PERFUSES PAR DU PACLITAXEL PENDANT 3 HEURES.	
	168

Liste des tableaux

TABLEAU 1: TABLEAU RESUMANT LES PRINCIPAUX MODELES EXPERIMENTAUX ETUDIANT LE PASSAGE TRANSPLACENTAIRE ET AUTRES FONCTIONS ASSOCIEES (D'APRES MYLLYNNEN AND VAHAKANGAS 2013) ..	40
TABLEAU 2: EXPRESSION DES PRINCIPAUX TRANSPORTEURS MEMBRANAIRES DE LA FAMILLE DES <i>SOLUTE CARRIER</i> (<i>SLC</i>) CHEZ L'HUMAIN	60
TABLEAU 3: EXPRESSION DES PRINCIPAUX TRANSPORTEURS MEMBRANAIRES DE LA FAMILLE DES <i>ATP-BINDING</i> <i>CASSETTE (ABC)</i> CHEZ L'HUMAIN	72
TABLEAU 4: CARACTERISTIQUES DES PATIENTS TRAITEES PAR DU PACLITAXEL DURANT LA GROSSESSE.	164
TABLEAU 5: EVOLUTION DU TAUX D'ARNM DES TRANSPORTEURS PLACENTAIRES ABC, APRES EXPOSITION AU PACLITAXEL	169
TABLEAU 6: EVOLUTION DU TAUX D'ARNM DES TRANSPORTEURS PLACENTAIRES SLC, APRES EXPOSITION DE PACLITAXEL	169

Introduction

Le cancer est la deuxième cause de mortalité chez les femmes âgées de 25 à 44 ans, et son occurrence chez la femme enceinte est estimée à environ à 1/1000 grossesses (Lee et al. 2012). En France, son incidence est estimée entre 500 et 1000 cas par an. L'âge croissant des femmes lors de la procréation dans les sociétés industrialisées conduit à s'attendre à une augmentation de l'association « cancer et grossesse » dans les années à venir (Mir, Berveiller, and Pons 2007).

Le cancer du sein semble le plus fréquemment rapporté chez les femmes enceintes, son incidence étant estimée entre 1 et 3 cas pour 10 000 grossesses (Loibl et al. 2006; Ring et al. 2005). Il représente à lui seul environ la moitié des cancers survenant pendant la grossesse (Fig.1).

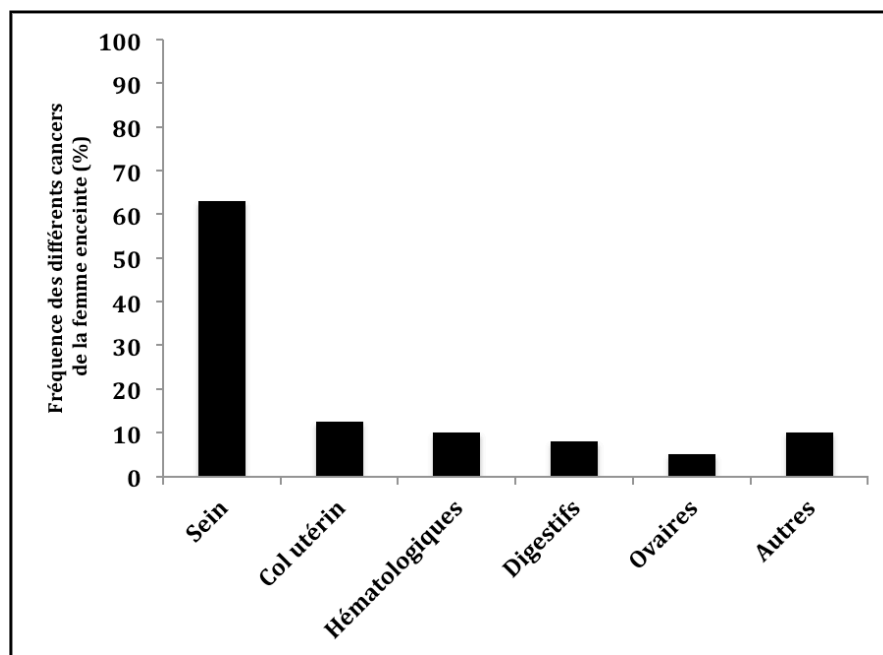


Figure 1: Epidémiologie des cancers touchant les femmes enceintes (Données CALG – 2009).

Le diagnostic d'un cancer chez une femme enceinte est un évènement dramatique, relativement fréquent, qui pose des problèmes humains, psychologiques, éthiques et médicaux qui seront détaillés ci-dessous.

Sur le plan thérapeutique, la chimiothérapie reste un traitement majeur du cancer, en

particulier dans le cas du cancer du sein (Berveiller and Mir 2012). Malgré la toxicité des agents antinéoplasiques, l'utilisation de certaines molécules peut être envisagée au cours de la grossesse (Mathieu et al. 2002; Germann et al. 2004; Ring et al. 2005; Mir et al. 2008), cependant, les données de toxicité restent parcellaires et les suivis à long terme quasiment inexistant (Mir and Berveiller 2012).

Dans les cancers du sein en particulier, les molécules de chimiothérapie les plus utilisées sont les anthracyclines, le cyclophosphamide et les taxanes (Loibl et al. 2012). Ces derniers (paclitaxel et docétaxel) sont des stabilisateurs du fuseau mitotique induisant *in fine* une apoptose (Vaclavikova et al. 2004). Ces deux molécules très utilisées en pratique quotidienne ont des propriétés pharmacologiques différentes, et faute de données concernant leur passage transplacentaire, le choix de l'une ou l'autre de ces drogues chez la femme enceinte reste encore largement empirique à ce jour.

Compte tenu du problème que pose cette situation dramatique qu'est la survenue d'un cancer du sein lors d'une grossesse, nous avons voulu étudier le passage transplacentaire des taxanes en utilisant un modèle expérimental de référence.

Nous avons étudié ensuite les répercussions que pouvaient avoir ces molécules sur le placenta en termes d'expression transcriptionnelle et protéique.

Nous avons également dressé une cartographie spatio-temporelle des différents transporteurs placentaires de médicaments et ce, du début de la grossesse jusqu'à son terme, afin de mieux comprendre les tenants et aboutissants du passage transplacentaire.

Pour ce faire, ce travail a été divisé en plusieurs parties, à savoir des rappels sur la physiologie du placenta et sur sa formation, puis une revue de la littérature sur les caractéristiques du passage transplacentaire, et enfin, une partie détaillée sur l'association « cancer et grossesse » en insistant sur les propriétés pharmacologiques des taxanes.

Nos travaux de recherche publiés ou en voie de publication ont été enfin détaillés dans les chapitres suivants.

I - Le placenta humain

A. Le développement du placenta humain

Le placenta humain est un organe autonome et transitoire qui permet le développement du fœtus et ce, grâce à sa fonction d'échange entre ce dernier et l'organisme maternel. Outre sa fonction d'échange, il a un rôle endocrine et immunitaire (Evain-Brion and Malassine 2003; Kumpel and Manoussaka 2012).

Il est composé de villosités choriales et il est caractérisé par une invasion majeure de l'endomètre par le trophoblaste, conduisant ce dernier au contact du sang maternel. On parle de placentation humaine de type hémomonochorial (Prouillac and Lecoecur 2010) (Figs. 2 et 3).

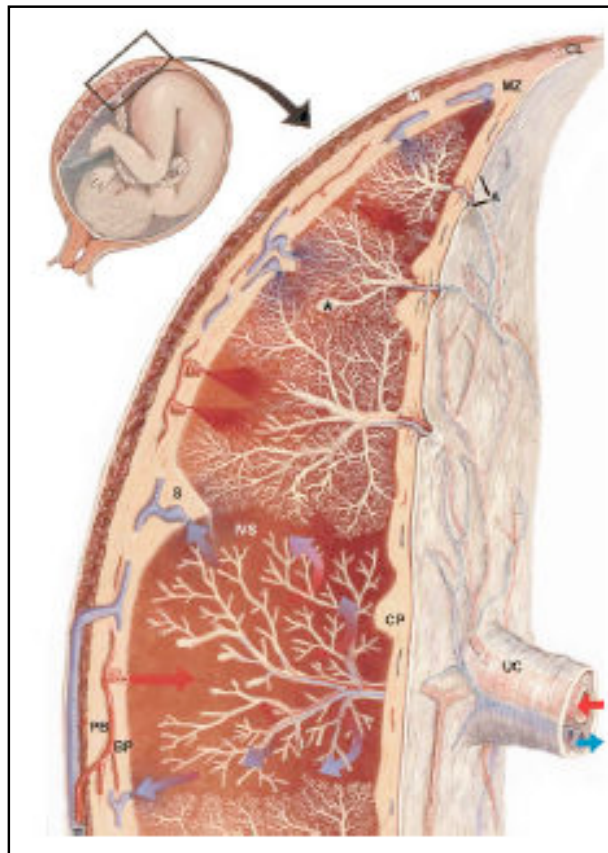


Figure 2: Le placenta humain (Benirschke et al. Pathology of the human placenta – 5th Ed – p.40).

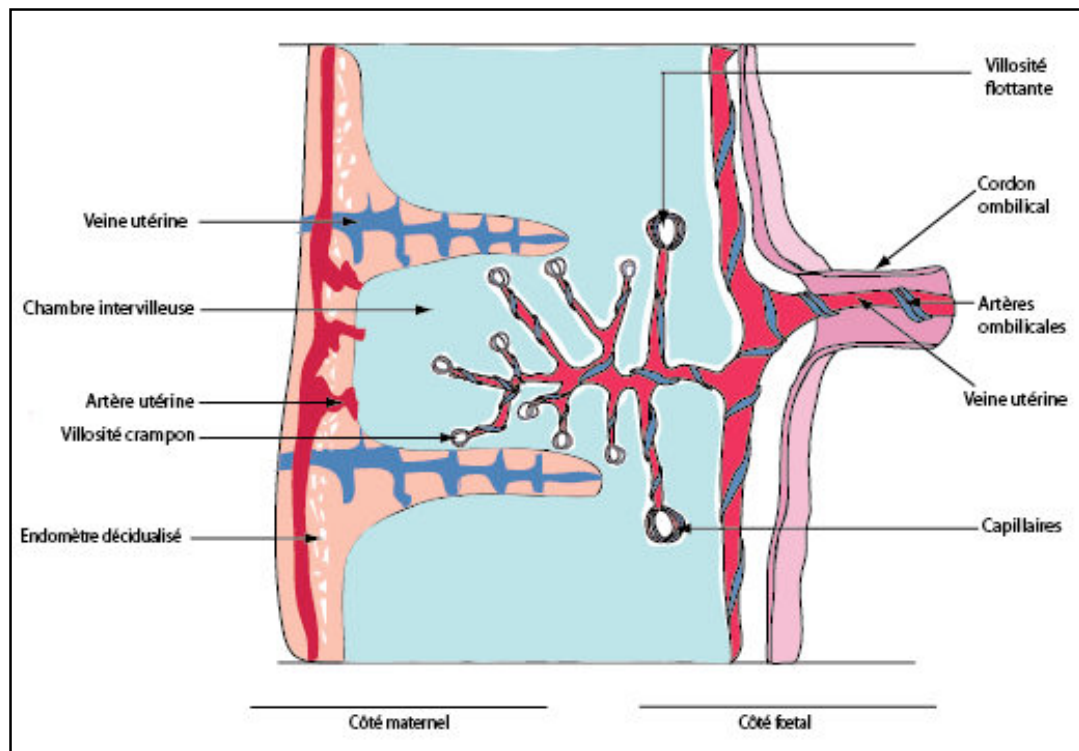


Figure 3: Représentation schématique d'une coupe placentaire transversale (d'après The McGraw-Hill Companies, 1997).

Le développement histologique du placenta se divise en trois stades : prélacunaire, lacunaire et villex (Fig. 4) (Myren et al. 2007; Berniske et al. 2000).

Stade prélacunaire

Six jours après la fécondation, le blastocyste qui est limité par une assise cellulaire (trophectoderme), s'accroche à l'épithélium utérin. Puis, à partir du trophectoderme, se différencie une assise cellulaire externe, le syncytiotrophoblaste (ST), et une assise cellulaire interne, constituée de cytotrophoblastes (CT) (Fig. 4) (Berniske et al. 2000). Le ST qui est très invasif à ce stade du fait d'une forte activité protéolytique, pénètre l'épithélium utérin et envahit l'endomètre aboutissant au final à la nidation du blastocyste.

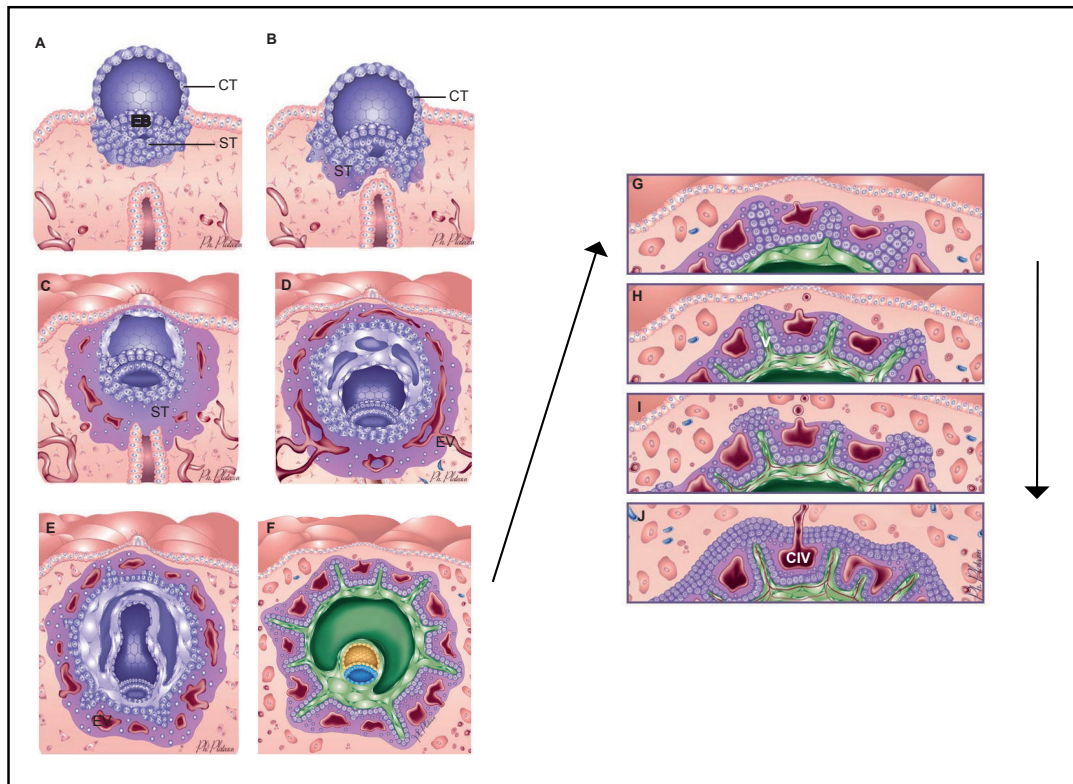


Figure 4: Représentation schématique des différentes étapes du développement du placenta humain (Illustrations : Ph. Plateaux).

Légendes: CIV : chambre intervillieuse (ébauche) ; CT: cytotrophoblaste; EB: bouton embryonnaire; EV: vaisseau endométtrial; ST: syncytiotrophoblaste; V : villosité primaire.

Stade lacunaire

Huit jours après la fécondation, des vacuoles apparaissent dans cette masse syncytiale. Ces vacuoles vont progressivement former des lacunes entre les travées syncytiales et diviser la masse trophoblastique en trois parties distinctes : la plaque chorale, la plaque basale et les chambres intervillieuses (Fig. 3) (Berniske et al. 2000).

Stade villeux

Treize jours après la fécondation, les CT qui étaient encore limités à une masse cellulaire interne, vont envahir les travées de syncytium formant ainsi les villosités choriales « primaires » (Fig. 4) (Berniske et al. 2000). Après deux semaines, le mésenchyme embryonnaire vient envahir ces villosités primaires pour venir former les villosités « secondaires » (Berniske et al. 2000). Enfin, les capillaires fœtaux apparaissent dans l'axe mésenchymateux, cette vascularisation est caractéristique de la formation de la villosité « tertiaire » (Berniske et al. 2000). En parallèle, le réseau vasculaire fœtal de l'allantoïde atteint la plaque choriale et se connecte aux vaisseaux des troncs villositaires. La villosité choriale apparaît dans sa constitution définitive vers la troisième semaine après la fécondation, mais le placenta atteint sa structure définitive vers la fin du premier trimestre (Figs. 5 et 6). Il est constitué de la plaque choriale, des chambres intervillueuses et de la plaque basale (Berniske et al. 2000). L'arbre villositaire est constitué de villosités crampons ancrées dans l'endomètre et de villosités choriales qui flottent dans l'espace intervilloux (Fig. 5).

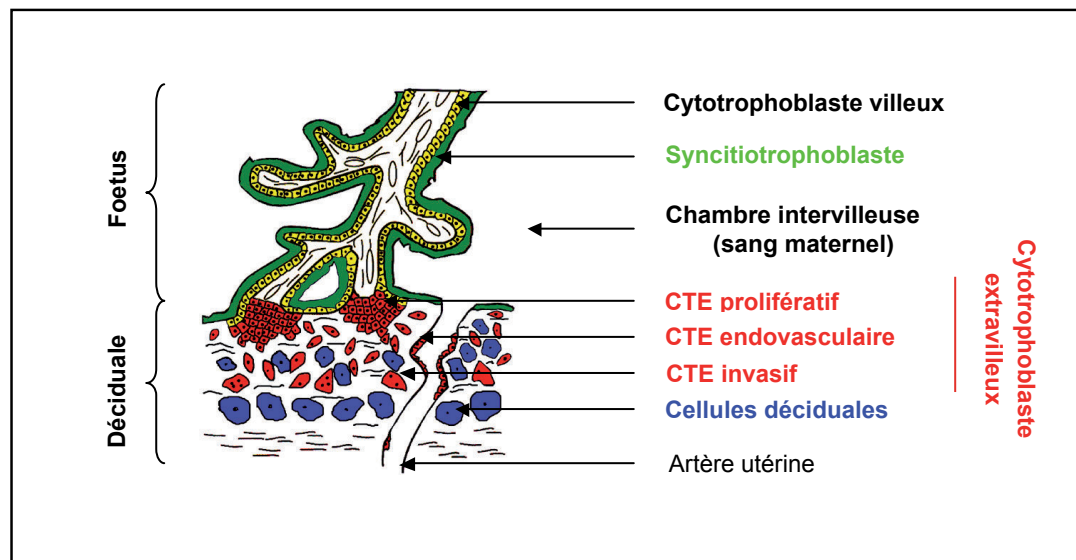


Figure 5: Représentation schématique d'une coupe longitudinale villosité choriale de placenta humain (d'après Danièle Evain-Brion, Ed.. Lavoisier, 2010, p.45).

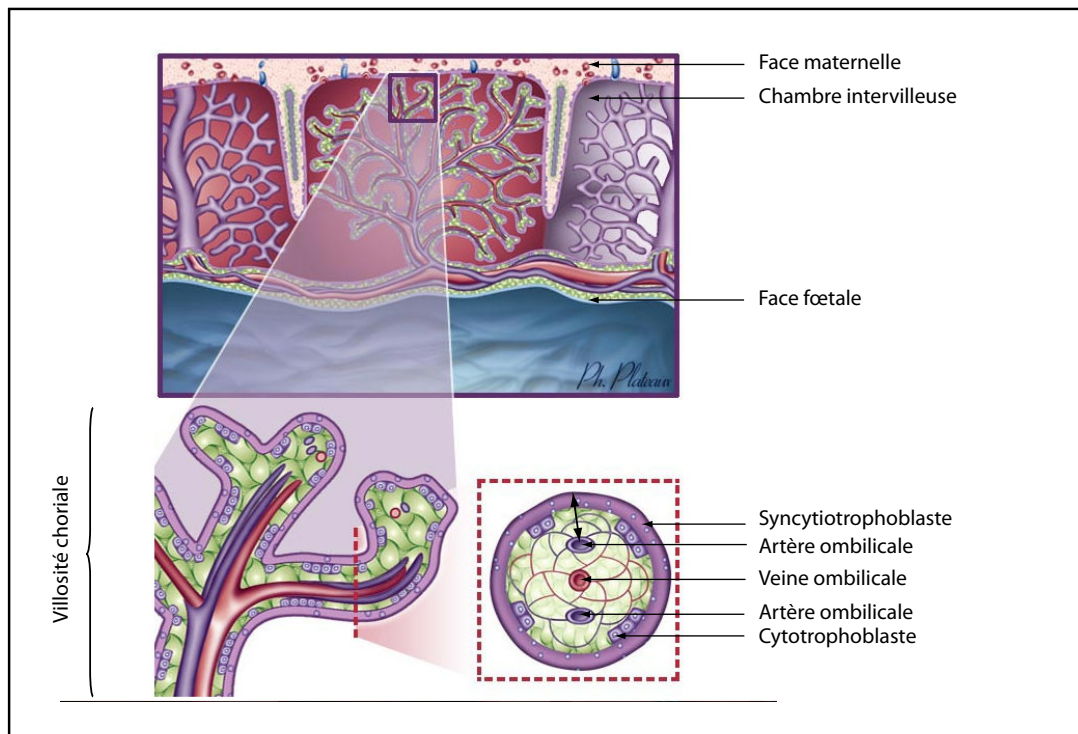


Figure 6: Représentation schématique d'une coupe de villosité et de la "barrière placentaire" (double flèche) (Illustrations: Ph. Plateaux).

Le trophoblaste villex et les villosités flottantes

Les villosités flottantes forment l'unité structurale et fonctionnelle du placenta humain. Elles se composent d'un axe mésenchymateux, de capillaires fœtaux et des macrophages appelés « cellules de Hofbauer » (Tang et al. 2011; Myren et al. 2007). Elles sont limitées d'une assise de cellules mononucléées: les CT villex qui après fusion, forment une masse cytoplasmique multinucléée et polarisée, le ST (Pidoux et al. 2007). Les circulations maternelle et fœtale ne se mélangent jamais ; elles sont séparées par différentes assises cellulaires constituées par les vaisseaux fœtaux, le mésenchyme et une couche trophoblastique représentée par la bordure syncytiale (caractéristique du placenta hémomonochorial) (Fig. 6) (Berniske et al. 2000). L'ensemble forme ce qu'on a appelé et qu'on appelle toujours de nos jours de façon probablement inappropriée : la « barrière » placentaire (Fig. 6) (Berniske et al. 2000).

Ce ST possède une membrane apicale bordée de nombreuses microvillosités qui se projettent dans l'espace intervilloux. Il est en contact direct avec le sang maternel de la chambre intervillieuse ; il est donc la zone privilégiée des échanges fœto-maternels. Il assure ainsi des fonctions d'échanges, métaboliques, endocrines mais aussi des mécanismes immunosuppresseurs ainsi que le transport des médicaments et xénobiotiques via les transporteurs de médicaments (Vahakangas and Myllynen 2009; Evain-Brion and Malassine 2003; Kumpel and Manoussaka 2012).

Les CT extravilloux et la villosité crampon

Au cours du premier trimestre, le placenta humain est caractérisé par une invasion profonde de la cavité utérine par les CT extravilloux (CTEV). L'origine de ces cellules n'est pas clairement connue; elles pourraient se différencier à partir d'une cellule souche non encore déterminée, commune ou non aux CT villoux.

Les CTEV situés à la base de la villosité crampon dans la colonne proximale, prolifèrent et se différencient en CT migratoires à partir de la colonne distale (Fig. 5). Ces cellules, extrêmement invasives, colonisent la décidue et le myomètre. De manière notable, ces phénomènes de prolifération et d'invasion sont des caractéristiques partagées avec les cellules malignes (Fisher and Damsky 1993). De fait, l'acquisition du phénotype invasif s'accompagne de mécanismes complexes tels que des modifications de l'expression des protéines d'adhésion intercellulaire, des protéines d'adhésion à la matrice extracellulaire et des remaniements du cytosquelette. Les CTEV produisent également des métalloprotéases (Xu et al. 2011) et expriment à leur surface des molécules du système HLA leur permettant d'échapper à la surveillance immunitaire maternelle alors que le fœtus correspond à une greffe semi-allogénique du fait de la présence des antigènes paternels (Kumpel and Manoussaka 2012).

Cependant, contrairement à l'invasion tumorale, l'invasion trophoblastique fait l'objet d'une régulation précise, spatiale et temporelle. Les trophoblastes extravilloux expriment des inhibiteurs des métalloprotéases qui permettent de contrôler l'avancée du trophoblaste dans l'endomètre décidualisé. D'autre part, les cellules déciduales, qui sont des cellules stromales de l'endomètre qui se différencient après l'ovulation

sous l'effet de la progestérone et des œstrogènes, participent activement à cette régulation. Ces cellules sécrètent des facteurs solubles qui modulent la synthèse des protéases et des protéines matricielles (Bischof and Campana 2000). Ainsi, l'invasion trophoblastique est limitée au tiers supérieur du myomètre. En effet, les trophoblastes extravilloux n'envahissent pas les veines mais spécifiquement les parois artérielles où ils détruisent la tunique élastique artérielle. Ils remplacent également les cellules endothéliales de la lumière artérielle, ils sont alors appelés CTEV endovasculaires (Fig. 5). Le développement du trophoblaste humain offre donc un modèle unique en physiologie humaine d'une invasion cellulaire complexe, sélective et contrôlée.

La mise en place de la circulation fœtale

Les premiers signes de vasculogénèse apparaissent donc au 21^{ème} jour après la fécondation par la différenciation des précurseurs de cellules endothéliales, les angioblastes. Cette différenciation est induite par le VEGF-A (*Vascular Endothelial Growth Factor-A*), produit entre autres par les trophoblastes, qui agit via deux récepteurs VEGFR-1 (*VEGF Receptor*, aussi appelé *Fms-like tyrosine kinase-1* ou *flt-1*) ou VEGFR-2 (aussi appelé *Kinase insert domain receptor* ou *KDR*). Le VEGF-A est également un puissant activateur de la prolifération des cellules endothéliales. Le placenta produit du PlGF (*Placental growth factor*), un puissant inducteur de la formation de nouveaux vaisseaux, ainsi que de l'angiopoïétine (Ang-1) (Kaufmann, Mayhew, and Charnock-Jones 2004; Demir et al. 2006).

La circulation fœto-placentaire est mise en place dès le 23^{ème} jour après la fécondation. Le cordon ombilical, individualisé dès quatre semaines après la fécondation, comprend deux artères qui mènent le sang de l'embryon vers le placenta et une veine qui ramène le sang ayant circulé dans les villosités chorales, vers le cœur de l'embryon.

La villosité chorale apparaît dans sa structure définitive dès la troisième semaine après la fécondation (Fig. 5) mais contrairement à cette dernière, le placenta n'atteint sa structure définitive que vers la fin du premier trimestre. A terme, le placenta est un disque de 20 cm de diamètre et de 3 cm d'épaisseur qui pèse environ 500 g. Il est composé d'une vingtaine de cotylédons séparés par les *septa*. Il peut

schématiquement être divisé en deux parties : la plaque chorale, composée des villosités flottantes dans l'espace intervilloux et située vers le fœtus, et la plaque basale, composée des villosités ancrées dans l'endomètre maternel (Fig. 7).

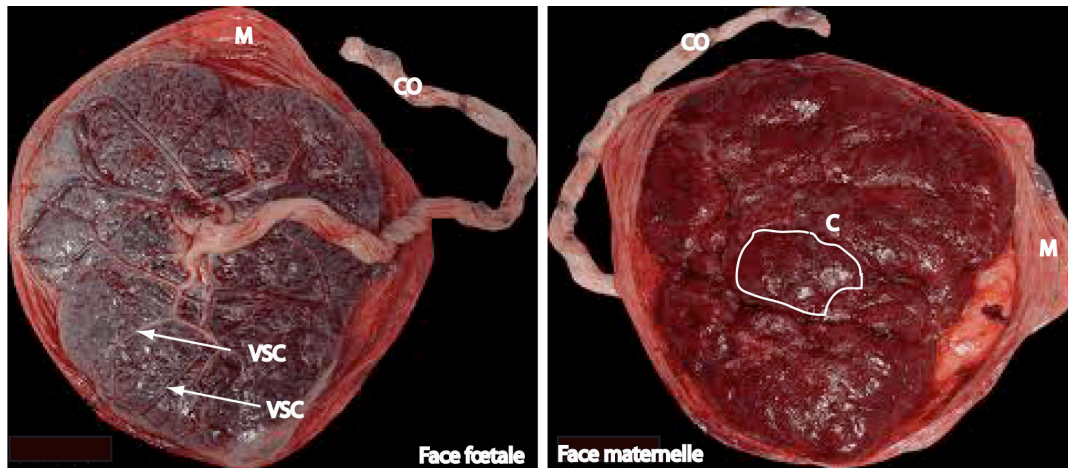


Figure 7: Vue macroscopique des deux faces d'un placenta humain (Photo - Aly Abbara).

Légendes: C: cotylédon; CO: cordon ombilical; M: membranes; VSC: vaisseaux sous choriaux.

La vascularisation utéro-placentaire

En 1754, John Hunter a mis en évidence pour la première fois que les circulations maternelle et fœtale ne communiquaient pas. A partir d'expériences d'injection de cire de différentes couleurs dans la veine et les artères utérines d'utérus gravides de femmes enceintes accidentées, Hunter a pu montrer trois faits nouveaux : 1) les artères maternelles traversent la décidue avec un trajet spiralé, 2) elles se jettent dans une structure spongieuse non composée de vaisseaux sanguins (première description de la chambre intervillouse) et, 3) les circulations maternelle et fœtale ne sont pas continues (Hunter, 1774). Il faudra ensuite attendre le début du XXème siècle pour obtenir le schéma de vascularisation utéro-placentaire connu à ce jour.

Dès l'implantation de l'embryon, un phénomène d'angiostimulation a lieu: vasodilatation de l'endomètre, enrichissement de la densité vasculaire et formation d'un réseau pérítrophoblastique serré entourant le sac gestationnel. Les artères utérines se divisent pour donner les artères arquées, qui vont secondairement donner les artères radiaires. Ces artères traversent le myomètre avant de se transformer en

artères spiralées au niveau de l'endomètre. Des artères radiaires, naissant également des artères basales, vascularisent l'endomètre profond. Les travaux de Ramsey et Harris ont permis de mieux comprendre les modifications des artères de l'utérus au cours de la grossesse (Ramsey 1966). Ils ont reconstitué le trajet des artères utéro-placentaires à différents stades de la grossesse, à l'aide d'injection d'encre de chine dans des utérus gravides avant fixation. Ils ont ainsi montré l'extraordinaire dilatation de la portion terminale de ces vaisseaux, permettant l'augmentation du débit sanguin utéro-placentaire nécessaire au bon développement fœtal (Fig. 8). Cette dilatation est obtenue grâce à un remodelage intense de ces artères utérines, remodelage qui résulte pour une grande partie de l'invasion trophoblastique.

A terme, le sang maternel traverse le myomètre via les artères utéro-placentaires remodelées et entre dans la chambre intervillieuse à une pression de 70 à 80 mmHg, qui chute à 10-30 mmHg au niveau de la plaque chorale. Le débit sanguin utéro-placentaire est de 600 mL/min au troisième trimestre de grossesse (Wilkening, Battaglia, and Meschia 1985). La majorité de cet apport sanguin utérin (90%) est destiné à la perfusion de la chambre intervillieuse où ont lieu les échanges entre la mère et le fœtus. Le sang est repris par les sinus veineux qui s'ouvrent largement dans la chambre intervillieuse puis par les veines utérines (Fig. 2).

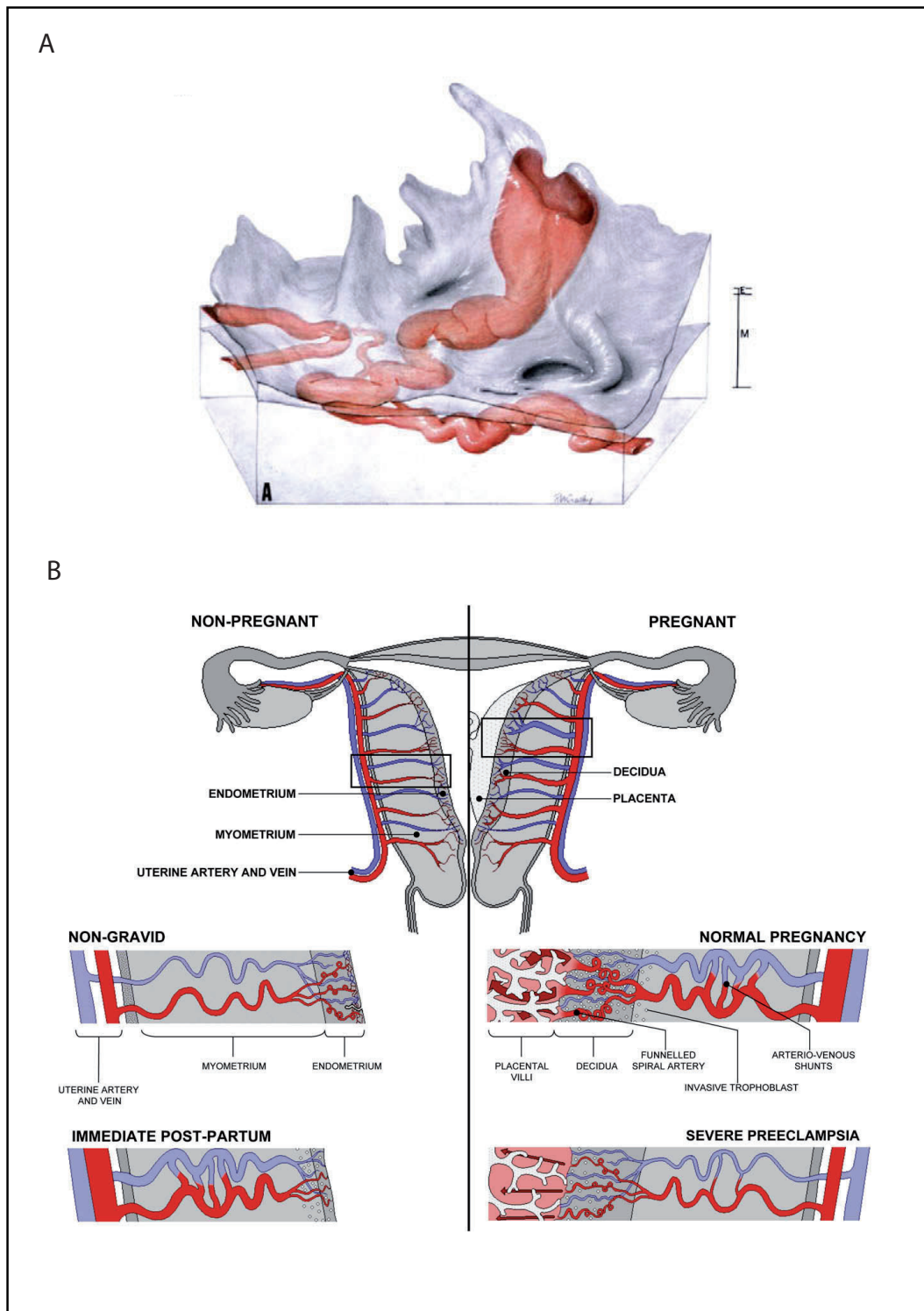


Figure 8: A: Reconstruction schématique faite à partir de coupes sériées d'une artère spiralée traversant le myomètre (M) puis l'endomètre (E) avant de s'ouvrir dans la chambre intervillieuse – B : Représentation schématique de la vascularisation utérine et placentaire dans différentes conditions (d'après Burton et al. 2009).

B. Le trophoblaste villositaire et la barrière placentaire

Comme exposé précédemment, la « barrière » placentaire est représentée par la distance séparant le sang maternel se trouvant dans la chambre intervillieuse et le sang fœtal se trouvant dans les capillaires fœtaux. Cette barrière est composée (en allant de la chambre intervillieuse vers le secteur fœtal) du ST revêtu d'une bordure en brosse sur son versant apical, du CT, d'un tissu mésenchymateux et de la paroi endothéliale des capillaires fœtaux (Figs. 6 et 9) (Myren et al. 2007).

Comme nous l'avons vu plus haut, le CT forme une assise unique et continue de cellules mononucléées qui au cours de la différenciation va aboutir à la fusion d'une partie d'entre elles pour venir former un élément cellulaire plurinucléé, le ST (Pidoux et al. 2007; Kliman et al. 1986). Ce ST est au contact direct du sang maternel (caractéristique du placenta hémochorial) via sa face apicale pourvue d'une bordure en brosse microvillositaire (Johnson et al. 1981). En plus d'un rôle de sécrétion endocrine établi (Pidoux et al. 2007), le CT et le ST sont le siège de nombreux transporteurs dont le rôle est fondamental dans le passage transplacentaire des médicaments en particulier (cf. *infra*).

Cette « barrière » présente une épaisseur relativement importante en début de grossesse (50 μm) qui va progressivement s'affiner en allant vers le terme de la grossesse (5 μm) (Vahakangas and Myllynen 2009). Ceci implique une modification des profils de passage transplacentaire de certaines molécules compte tenu des déterminants de ce dernier tels que le poids moléculaire, la lipophilie, l'état d'ionisation au pH physiologique (cf. *infra*). De plus, les faces cellulaires du ST ne sont pas identiques, aussi bien en terme architecturaux, d'expression enzymatique et de récepteurs hormonaux, mais également en termes d'expression de transporteurs de médicaments (cf. *infra*) (Vahakangas and Myllynen 2009).

L'étude du CT dans sa globalité (différenciation, expression d'ARNm/protéique) semble donc primordiale afin de comprendre le fonctionnement de la barrière placentaire. Pour ce faire, il existe plusieurs modèles expérimentaux, modèles qui

seront détaillés précisément dans le chapitre suivant (cf. *infra*).

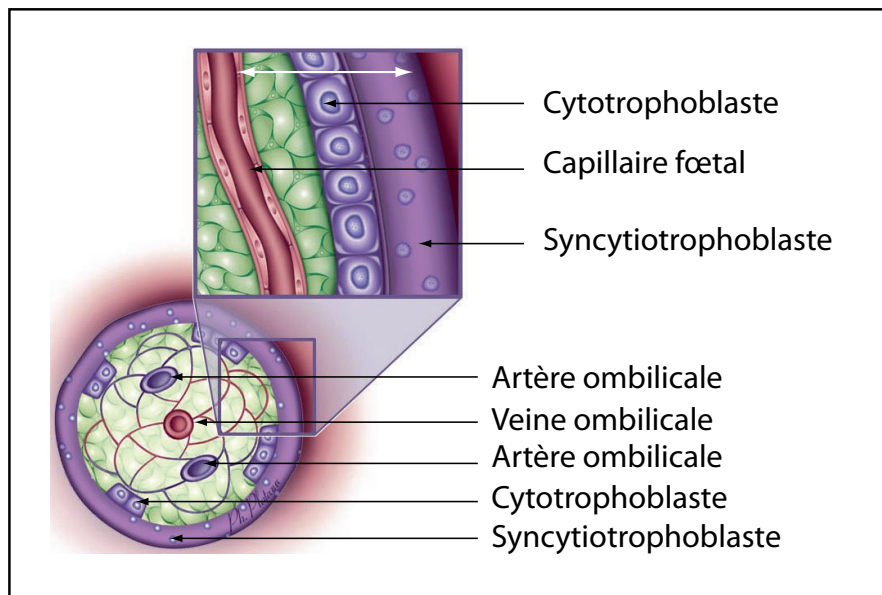


Figure 9: Coupe d'une villosité chorale – Mise en évidence de la «barrière » placentaire (double flèche blanche) – Illustrations : Ph. Plateaux

Il est dès lors nécessaire, compte tenu de l'existence de ces différents modèles d'étude du trophoblaste, de s'intéresser aux déterminants du passage transplacentaire des médicaments et d'en détailler les différents modes d'étude expérimentale.

II - Le passage transplacentaire des médicaments

A. Les déterminants du passage transplacentaire

Les échanges transplacentaires impliquent plusieurs phénomènes tels que la diffusion passive, la diffusion facilitée, le transport actif, la phagocytose et la pinocytose (Pacifici and Nottoli 1995). Pendant plusieurs décennies, seul était considéré le mécanisme de diffusion passive alors que depuis quelques années, le transport actif est de plus en plus étudié et principalement les médicaments qui en sont les substrats. En ce qui concerne la pinocytose ainsi que la phagocytose, ces mécanismes semblent trop lents pour influencer de façon majeure sur le passage transplacentaire des médicaments (Syme, Paxton, and Keelan 2004) et semblent intéresser plus particulièrement les immunoglobulines (Fuchs and Ellinger 2004). Pour ces raisons, ces deux derniers modes de transport ne seront donc pas traités ici (Marin, Briz, and Serrano 2004).

Ainsi, nous détaillerons principalement les trois modes de transport transplacentaires principaux :

1. La diffusion passive

Il s'agit du mode de transport placentaire principal dans le placenta humain (Syme, Paxton, and Keelan 2004). Ce mécanisme repose sur le principe que les molécules traversent les membranes biologiques selon le gradient de concentration. Une autre caractéristique de ce mode de transport est qu'il ne nécessite pas l'apport d'énergie (Pacifici and Nottoli 1995).

Ce transport est régi selon la loi de Fick : $\text{taux de transfert} = [K \times S(C_2 - C_1)]/d$, où K représente la constante de diffusion basée sur les caractéristiques physico-chimiques

de la drogue ; S représente la surface de la membrane biologique et d son épaisseur, tandis que C_1 et C_2 sont les concentrations de la drogue de part et d'autre de la membrane biologique. Ainsi $C_2 - C_1$ représente le gradient de concentration de part et d'autre de la membrane biologique étudiée.

La diffusion passive des médicaments à travers le placenta est donc fonction (entre autres) de la surface et de l'épaisseur de la barrière placentaire. Pour mémoire, la surface villositaire croît durant la grossesse passant de 3.4 m^2 à 28 SA (semaines d'aménorrhée) à 12.6 m^2 à terme (Aherne and Dunnill 1966) alors que l'épaisseur de la barrière placentaire diminue de $50 \text{ }\mu\text{m}$ en début de grossesse à $5 \text{ }\mu\text{m}$ sur les placentas à terme (Syme, Paxton, and Keelan 2004). Dès lors, plus le placenta approche du terme, plus la diffusion passive est augmentée, ce qui présente l'avantage d'exposer le moins possible le fœtus en début de grossesse, période très sensible et cruciale pour le développement fœtal.

Par ailleurs, K qui représente une constante physico-chimique de la molécule étudiée dépend de plusieurs facteurs dont le premier est le poids moléculaire (Moore, Hellegers, and Battaglia 1966). En effet, plus celui-ci est élevé, moins les molécules passent les barrières biologiques. Le seuil fixé est aux alentours de 500 kDa (g/mol), ce qui représente un facteur modérément limitant étant donné que la plupart des molécules médicamenteuses présentent des poids moléculaires inférieurs à 500 kDa (Pacifci and Nottoli 1995). Au-dessus de 1000 kDa , les molécules ont un passage membranaire très limité comme par exemple les héparines de bas poids moléculaire qui ne traversent pas le placenta humain (Syme, Paxton, and Keelan 2004; Schneider, Heilmann, and Harenberg 1995).

Un autre critère physico-chimique est représenté par la liposolubilité. La plupart des molécules médicamenteuses sont des acides faibles ou des bases et sont donc dissociées au pH physiologique. Ainsi, les molécules médicamenteuses qui sont liposolubles traversent plus aisément une bicouche lipidique que ne le font les molécules hydrophiles (Syme, Paxton, and Keelan 2004).

La ionisation au pH physiologique est aussi un point capital des propriétés physico-chimiques des médicaments. En effet, dans sa forme ionisée, une molécule est chargée et ne peut donc pas théoriquement traverser une membrane biologique (Syme, Paxton, and Keelan 2004). Étant donné que le pH maternel est seulement plus

élevé de 0.1 unité que le pH fœtal, la différence de pH est faible et ne semble pas jouer un rôle important. Mais il faut noter que dans certaines situations où le pH fœtal peut diminuer, il y a une diminution importante du transfert de molécules basiques vers le côté maternel, comme cela a pu être montré avec la lidocaïne (Garland 1998).

La liaison aux protéines plasmatiques de la molécule étudiée est le dernier point important des constantes physico-chimiques. En effet, les molécules qui sont fortement liées aux protéines ont une taille trop importante pour traverser une membrane biologique (Syme, Paxton, and Keelan 2004). Mais, étant donné que la liaison aux protéines est un phénomène transitoire, une fois séparée de la protéine, une molécule peut traverser la barrière placentaire avant d'être à nouveau prise en charge par une autre protéine (Syme, Paxton, and Keelan 2004). En général, la concentration de molécule « libre » établit un équilibre de part et d'autre de la barrière biologique, sauf lorsque le passage est lent (Hill and Abramson 1988). On comprend dès lors qu'une molécule faiblement liée aux protéines plasmatiques a plus de probabilités de traverser la barrière placentaire et atteindre la circulation fœtale dans sa forme active, à savoir « libre ». Bien qu'il existe un grand nombre de protéines plasmatiques, ce sont surtout l'albumine et l' α -1 glycoprotéine acide ou orosomucoïde qui sont liées aux molécules médicamenteuses. On notera toutefois que les médicaments acides lipophiles sont en général liés à l'albumine alors que l'orosomucoïde sera volontiers liée aux molécules basiques lipophiles (Wood and Wood 1981).

Par ailleurs, il est intéressant de noter que l'équation de Fick ne prend pas en compte le flux sanguin alors que certains auteurs ont montré que la distribution des médicaments dans les tissus pouvaient être dépendante du flux sanguin (Reynolds and Knott 1989). En effet, il est à noter que le flux sanguin placentaire augmente durant la grossesse, passant de 50 mL/min à 10 SA, à 600 mL/min en fin de grossesse (Syme, Paxton, and Keelan 2004). Ainsi, pour les drogues dont les concentrations ne sont pas à l'équilibre (*steady state*), le passage transplacentaire peut varier en fonction du débit sanguin, en étant accéléré ou retardé (Syme, Paxton, and Keelan 2004).

Les modifications de flux sanguin peuvent également jouer un rôle pendant le travail. En effet, le débit placentaire étant diminué pendant le travail, cela peut jouer un rôle en diminuant bien entendu le passage de certaines molécules vers le secteur fœtal,

mais aussi en diminuant l'élimination d'autres molécules présentes dans le sang fœtal (Syme, Paxton, and Keelan 2004), et ainsi lui faire courir un risque en cas de médicament potentiellement toxique.

2. La diffusion facilitée

La diffusion facilitée suppose l'existence d'un transporteur de molécule sans pour autant nécessiter la présence de substrat énergétique. De plus, ce mode de transport peut être saturé aux hautes concentrations (Syme, Paxton, and Keelan 2004).

En suivant le gradient de concentration, la diffusion facilitée aboutit à une concentration de la molécule égale de chaque côté de la membrane biologique. Ainsi, les carbohydrates peuvent être pris en charge par diffusion facilitée afin d'augmenter les apports glucidiques du fœtus lorsque ces derniers sont insuffisants par diffusion passive ou par les autres voies métaboliques (Syme, Paxton, and Keelan 2004).

A ce jour, peu de molécules médicamenteuses sont connues pour utiliser ce système de diffusion facilitée (Syme, Paxton, and Keelan 2004). En effet, hormis le ganciclovir, la céphalexine (un antibiotique de la famille des céphalosporines) et certains glucocorticoïdes qui semblent avoir leur propre transporteur (Kudo et al. 1989; Henderson et al. 1993; Fant, Yeakley, and Harrison 1983), il n'y a que peu de données concernant un éventuel transport facilité pour les autres drogues. De plus, pour le ganciclovir, la diffusion facilitée interviendrait au début de l'exposition médicamenteuse avec un influx à travers la membrane du ST, puis le relai du transport serait ensuite effectué par diffusion passive (Henderson et al. 1993).

Il semblerait que la diffusion facilitée soit essentiellement utilisée pour des molécules endogènes comme certaines hormones ou certains nucléosides (Syme, Paxton, and Keelan 2004).

3. Le transport actif

Le transport actif, via un transporteur (ou « pompe »), présente la particularité de

nécessiter de l'énergie, apportée soit par l'hydrolyse de l'ATP (adénosine triphosphate), soit stockée au niveau du gradient électrochimique transmembranaire permis par les ions Na^+ , Cl^- et H^+ (on parle alors volontiers de co-transporteurs secondaires). Ce transport a la particularité de pouvoir se faire dans le sens inverse du gradient de concentration, sachant que ce phénomène peut être saturé (Seeds 1968).

De nombreux auteurs ont étudié le transport actif d'un certain nombre de substrats endogènes comme les vitamines, le glucose, les acides aminés ou les hormones, provoquant un certain délai dans l'apport de données sur le transport actif des médicaments (Syme, Paxton, and Keelan 2004). D'une manière générale, les médicaments qui sont pris en charge de façon active par un transporteur présentent des caractéristiques communes avec les substrats endogènes pris en charge par ce type de transporteur (Syme, Paxton, and Keelan 2004).

Concernant la localisation de ces transporteurs actifs, ces derniers peuvent se trouver

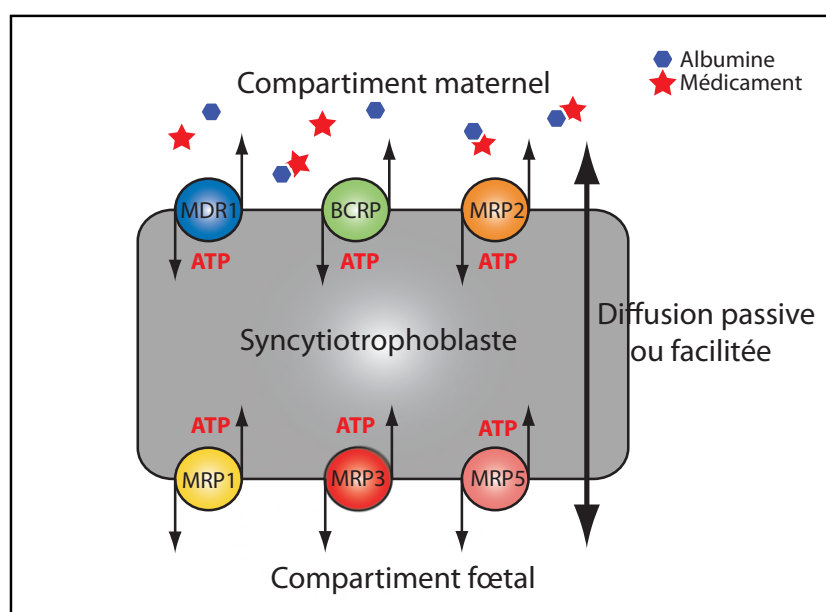


Figure 10: Schéma de certains transporteurs actifs de médicaments retrouvé au niveau du syncytiotrophoblaste humain (BCRP : Breast Cancer Resistance Protein ; MDR : Multi-Drug Resistance ; MRP : Multi-drug-associated Resistance Protein)

au niveau de n'importe quelle face cellulaire, aussi bien au niveau apical du ST (bordure en brosse) qu'au niveau basal, au niveau du CT, mais aussi au niveau de l'endothélium des capillaires fœtaux. Ainsi, il ne s'agit pas seulement de pompes d'efflux mais aussi de pompes d'influx, la caractéristique essentielle étant le siège de

ces transporteurs (Fig. 10). Il faut noter également que les transporteurs exprimés au niveau apical et basal, ne sont pas les mêmes, ceci aboutissant à un transport « polarisé » de la barrière trophoblastique (Fig. 10).

Ces transporteurs peuvent augmenter (transporteurs d'influx) ou diminuer (transporteurs d'efflux) la concentration de composés au niveau intracellulaire (Klaassen and Lu 2008). Ainsi, un transporteur d'efflux localisé sur le versant apical du ST pourra protéger le fœtus d'une molécule, alors que le même transporteur localisé sur le versant basal aura l'effet opposé (Vahakangas and Myllynen 2009). De manière intéressante, les transporteurs localisés sur différentes faces cellulaires peuvent avoir un effet synergique comme cela avait été supposé pour ABCG2 et SLCO2B1 (Vahakangas and Myllynen 2009).

Ainsi, l'effet « net » du passage d'une molécule est déterminé par la présence de ces transporteurs actifs et par leur localisation respective, pouvant aboutir ou non à des répercussions fœtales. Assez étonnamment, les données concernant les transporteurs placentaires de médicaments sont encore rares, et nombre d'entre eux n'ont pas de rôle encore déterminé, voire pas de localisation définie.

L'ensemble de ces caractéristiques du passage transplacentaire rend ce dernier fort complexe à apprécier, d'où la nécessité de mettre en place des modèles expérimentaux pour essayer d'en comprendre la physiologie et d'aboutir *in fine* à des résultats proches de ce qui se déroule en conditions *in vivo*.

B. Les différents modèles d'étude du passage transplacentaire des médicaments

Pour évaluer le passage transplacentaire des médicaments mais aussi, de façon plus générale la physiologie placentaire, de nombreux modèles expérimentaux sont à la disposition des équipes de recherche. Ces modèles présentent des avantages/inconvénients qui sont détaillés ci-dessous (Tableau 1).

1. Modèle du cotylédon placentaire perfusé

Cela fait maintenant plusieurs décennies que les chercheurs essaient de déterminer le

passage transplacentaire des drogues et d'en comprendre les tenants et aboutissants.

L'étude du passage transplacentaire a été principalement initiée par Panigel et coll. il y a maintenant une quarantaine d'années (Panigel 1962), avec notamment la mise au point d'un modèle de référence qui est celui du cotylédon placentaire perfusé, utilisé par de nombreuses équipes internationales, dont les principes ont été détaillés par la suite par Schneider et coll. (Schneider, Panigel, and Dancis 1972).

Ce modèle de perfusion *ex vivo* est à ce jour la seule méthode restituant les conditions physiologiques de fonctionnement *in utero* du placenta humain au troisième trimestre de la grossesse. Cette technique consiste à rétablir la double circulation materno-fœtale sous contrôle du pH, de la température et des débits de perfusion. La perfusion peut avoir lieu en circuit « ouvert/ouvert », à savoir qu'il n'y a pas de recirculation des perfusats fœtal ni maternel ; en circuit « fermé/fermé » où la recirculation a lieu ou enfin en circuit « fermé/ouvert » où un des perfusats recircule (Myllynen and Vahakangas 2013). Le circuit « en ouvert » permet d'étudier le passage transplacentaire « brut » d'une molécule, alors que le circuit fermé a l'avantage d'explorer en outre le métabolisme placentaire. La durée de ces perfusions varie entre 90 minutes et 6 heures en général, même si dans certaines études, la perfusion a pu duré jusqu'à 48 heures (Myllynen and Vahakangas 2013).

Plusieurs critères existent afin de confirmer la validité de la perfusion. En effet, les éventuelles fuites de perfusats sont vérifiées durant toute la procédure. L'utilisation de l'antipyrine est également largement employée afin d'évaluer « l' *overlap* » entre la circulation maternelle et fœtale.

La méthode du cotylédon perfusé permet d'étudier le passage transplacentaire « à terme » ou dans une période s'en approchant (27- 41SA) (Myllynen and Vahakangas 2013). L'écueil principal est qu'il est pour l'heure impossible d'utiliser ce modèle pour des termes inférieurs, alors que l'exposition aux xénobiotiques pose essentiellement un problème dans cette période d'intérêt. Il est par ailleurs délicat d'extrapoler les données observées « à terme » sachant que des modifications majeures ont lieu tout au long de la grossesse, aussi bien du point de vue architectural avec une diminution de l'épaisseur de la barrière placentaire, mais aussi sur le plan fonctionnel avec une expression différentielle des transporteurs placentaires (cf. chapitre « transporteurs placentaires ») (Myllynen and Vahakangas 2013).

Par ailleurs, d'autres facteurs varient durant la grossesse et peuvent influencer sur le passage transplacentaire ; ainsi l'albuminémie diminue tout au long de la grossesse, pouvant faire varier de façon significative le passage transplacentaire des médicaments fortement liés à l'albumine (Krauer, Dayer, and Anner 1984; Berveiller et al. 2012).

Enfin, les polymorphismes interindividuels peuvent jouer un rôle dans le passage transplacentaire et notamment dans l'expression des transporteurs de médicaments, aboutissant à de larges variabilités et entraînant la nécessité d'augmenter le nombre d'expérimentations (Myllynen and Vahakangas 2013; Berveiller et al. 2012).

Cela dit, les dernières données disponibles dans la littérature semblent confirmer que ce modèle est efficace pour prédire le passage transplacentaire *in vivo* « réel » (Hutson et al. 2011). En effet, une équipe a analysé les résultats d'expériences réalisées à l'aide du modèle du cotylédon perfusé, et comparé ces derniers avec ceux issus de données cliniques (prélèvement de sang de cordon et de sang maternel). La corrélation retrouvée était très satisfaisante avec un $R^2=0.85$, $p<0.0001$ (Hutson et al. 2011). De manière intéressante, la corrélation des résultats entre différents laboratoires semblait tout aussi satisfaisante (Myllynen et al. 2010).

2. Modèle des lignées cellulaires cancéreuses

D'autre part, hormis le modèle *ex vivo*, des modèles *in vitro* existent, principalement basés sur la culture cellulaire de lignées cancéreuses (*BeWo*, *JEG-3*, *JAr*). Leur intérêt principal est de permettre d'étudier les flux des molécules étudiées au travers de cultures cellulaires monocouches, présentant comme avantage d'avoir un phénotype stable, une durée de vie prolongée et une grande facilité de mise en culture.

Des cultures monocouches de *BeWo* ont été utilisées par exemple afin d'étudier les flux de vincristine (Ushigome et al. 2000), ou le transfert placentaire de la mélamine (Partanen et al. 2012). Les lignées peuvent également servir à évaluer l'effet d'une molécule sur l'expression de certains transporteurs de médicaments (Myllynen and Vahakangas 2013).

L'utilisation des lignées cellulaires est basée sur le fait qu'il existe des points communs entre ces dernières et le trophoblaste humain. Par exemple, les *BeWo* issues

de choriocarcinomes, possèdent des caractéristiques communes avec des trophoblastes indifférenciés, alors que les JEG-3 ont plus de points de ressemblance avec le ST (tout en étant mononucléées) (Myllynen and Vahakangas 2013). Ainsi, récemment, une équipe a comparé le passage transplacentaire de polychlorobiphényle dans un modèle *ex vivo* de perfusion placentaire et dans un modèle *in vitro* de monocouche de BeWo b30, en trouvant des résultats peu différents et donc potentiellement encourageants (Correia Carreira et al. 2011).

Cependant, des différences cruciales existent, de taille, puisque par exemple certains transporteurs sont peu ou pas du tout exprimés par les lignées cellulaires alors qu'ils le sont par le trophoblaste humain (Evseenko, Paxton, and Keelan 2006; Serrano et al. 2007).

Ainsi, les résultats issus d'études utilisant des modèles de lignées cellulaires doivent être interprétés avec prudence compte tenu des différences morphologiques mais aussi fonctionnelles notables qui existent entre elles et les cellules trophoblastiques physiologiques (King, Thomas, and Bischof 2000).

3. Modèle de culture primaire de trophoblastes humains

Bien que le modèle de culture primaire soit de plus en plus utilisé, il n'en reste pas moins un modèle difficile à mettre en pratique et dont les succès de réalisation sont soumis à de nombreux facteurs difficiles à apprécier (Myllynen and Vahakangas 2013). Le principe est de réaliser des digestions enzymatiques (trypsine) sur des villosités chorales, puis de réaliser plusieurs étapes de purification (variant suivant les équipes). Les CT fraîchement isolés peuvent être utilisés directement ou être mis en culture pendant plusieurs jours. Ces CT vont progressivement fusionner pour former des éléments plurinucléés, le ST. A chaque étape, il est possible de vérifier la validité de la technique par l'observation macroscopique ou par une technique d'immunocytochimie (formation de ST), mais également par l'évaluation de la sécrétion d'hormone gonadotrophine chorionique (hCG) par le ST (cf. *infra*) (Massin et al. 2001).

L'avantage majeur de ce modèle est de travailler sur des cellules physiologiques, n'ayant pas été transformées, à l'opposé des lignées cancéreuses. De plus, ces cellules

purifiées permettent d'étudier des profils d'expression de façon très précise, à l'opposé des modèles utilisant des fragments placentaires totaux (nombreuses cellules présentes comme le ST, le CT, les fibroblastes, les hématies...), comme cela avait pu être montré avec la superoxyde dismutase (profils d'expression différents entre les deux modèles expérimentaux) (Frendo et al. 2000).

Ces cultures primaires permettent en outre d'étudier des influx ou efflux de molécules, voire le métabolisme de certains xénobiotiques. De façon intéressante, il est possible de réaliser des expérimentations sur des trophoblastes issus de placentas de différents termes, permettant ainsi d'apporter des données sur le début de grossesse notamment.

Concernant les inconvénients de cette technique :

- Il est très difficile de réaliser une monocouche jointive avec les CT issus de culture primaire, et de ce fait, l'étude du passage d'une molécule paraît compromise (Bode et al. 2006). Cependant, certains auteurs ont essayé de superposer plusieurs assises de CT en culture de façon à créer une « barrière » étanche, mais le modèle décrit ne peut être utilisé en routine actuellement (Hemmings et al. 2001).
- Un autre écueil réside dans le fait que ces cellules obtenues n'ont pas le pouvoir de se multiplier comme peuvent le faire les cellules issues de lignées cancéreuses (Myllynen and Vahakangas 2013), et se dirigent vers la mort cellulaire en général après 3 jours de culture.

4. Explants villositaires

Cette technique, largement utilisée, consiste à prélever une villosité à l'état frais et à la mettre en culture. De nombreux types cellulaires sont présents dans ce type de modèle (cellules endothéliales ou mésenchymateuses, hématies, cellules immunitaires, etc.), ceci pouvant représenter un avantage du fait de la proximité avec la physiologie, mais aussi un inconvénient majeur car nuisant à la pureté du modèle. Ce modèle permet d'étudier le métabolisme de certains xénobiotiques, la régulation des transporteurs de médicaments. Cependant, étant donné qu'il s'agit de fragments tissulaires, l'évaluation du passage transplacentaire n'est pas permise (Myllynen and

Vahakangas 2013).

5. Fractions cellulaires

D'autres modèles *in vitro* existent et sont utilisés de manière plus anecdotique, comme les vésicules de membranes microvillositaires. Les membranes basales et/ou apicales peuvent être isolées afin d'étudier les mécanismes basiques de transport cellulaire (Myllynen and Vahakangas 2013). Ainsi, leur utilisation a été reportée par exemple afin d'étudier les flux membranaires de vinblastine, où l'expression et la fonction des transporteurs d'hormones thyroïdiennes (Ushigome et al. 2003; Loubiere et al. 2012). Même si la pureté des membranes isolées semble fiable (Glazier and Sibley 2006), ce modèle est loin de représenter un modèle reflétant la physiologie, et sera volontiers utilisé aux stades préliminaires des expérimentations, et lorsque les autres modèles ne sont pas forcément réalisables ou accessibles.

D'autres fractions cellulaires peuvent être utilisées comme les fractions microsomales. Elles dérivent du réticulum endoplasmique et sont isolées après diverses étapes de centrifugation. Leur utilisation réside principalement dans l'étude du métabolisme des xénobiotiques compte tenu du fait que ces fragments membranaires sont pourvus de nombreux cytochromes (Vahakangas et al. 1989).

Matériel	Modèle ex vivo/in vitro	Utilisation pour
Tissu total	Perfusion placentaire ex vivo	Passage transplacentaire des xénobiotiques, métabolisme des xénobiotiques et fonction des transporteurs membranaires
Fragments placentaires	Culture d'explant	Mécanismes régulant le passage transplacentaire, métabolisme cellulaire, influx et efflux cellulaire
Cellules	Culture primaire de trophoblaste Lignées cellulaires (BeWo, JEG-3, Jar)	Mécanismes régulant le passage transplacentaire, métabolisme cellulaire, influx et efflux cellulaire
Monocouche cellulaire "serrée sur membrane semi-perméable"	BeWo b30	Passage transplacentaire des xénobiotiques, métabolisme des xénobiotiques et fonction des transporteurs membranaires
Fractions cellulaires	Vésicules membranaires	Fonction des transporteurs placentaires
	Fractions microsomales	Métabolisme des xénobiotiques

Tableau 1: Tableau résumant les principaux modèles expérimentaux étudiant le passage transplacentaire et autres fonctions associées (d'après Myllynen and Vahakangas 2013)

C. Les transporteurs placentaires – Revue de la littérature

Comme introduit plus haut, les transporteurs de médicaments ont un rôle clé dans le passage transplacentaire de ces derniers. Depuis quelques années, d'importants progrès ont été réalisés dans la caractérisation de ces transporteurs, de leur fonctionnalité et de leur localisation, cependant de nombreuses données restent à ce jour inconnues.

La revue de la littérature suivante permet de dresser un état des lieux des connaissances sur les transporteurs placentaires décrits à ce jour.

1- Les transporteurs « Solute Carrier » - SLC (Tableau 2)

La superfamille des *solute carrier transporters* (SLC transporters) regroupe plus de 300 gènes divisés en 46 sous-familles (Fredriksson et al. 2008). Les SLC transportent une large variété d'éléments à l'intérieur de la cellule comme des acides aminés, des ions inorganiques, des nucléosides, des sucres, des acides gras voire des neuromédiateurs. Par ailleurs, les SLC sont responsables du transport de substances exogènes comme par exemple de nombreux médicaments (Nakanishi and Tamai 2011).

Les SLC sont exprimés de façon ubiquitaire dans l'organisme, et principalement localisés dans la membrane plasmique de cellules endothéliales ou épithéliales au niveau des barrières biologiques telles que l'intestin, le rein, la barrière hémato-encéphalique ou le placenta (Nakanishi and Tamai 2011). Les SLC sont divisés en plusieurs grandes familles, telles que les OATP, les OAT, les OCT, les MCT, les transporteurs d'acides aminés, les transporteurs de glucose, les transporteurs de peptides (Nakanishi and Tamai 2011).

Organic anion-transporting polypeptides (OATP)

Les OATP jouent un rôle important dans le transport de molécules au niveau intestinal, rénal, hépatique et placentaire (Hagenbuch and Gui 2008).

Les membres suivants des AOTP/SLCO ont été décrits au niveau du placenta (OATP1A2, OATP1B1/3, OATP-2B1, OATP-3A1, OATP4A1 (Prouillac and Lecoecur 2010). Ces transporteurs sont impliqués dans l'influx des acides biliaires (sodium-indépendant) dans les hépatocytes mais leur rôle précis dans le placenta n'a pas à ce jour été démontré.

Le transporteur OATP2B1/SLCO2B1 (OATP-B), retrouvé sur la face basale du ST aussi bien en ARNm qu'en western blot et immunohistochimie (Grube et al. 2007), semble jouer un rôle dans le transport des stéroïdes sulfates dans le placenta humain (Grube et al. 2007). A noter que certains auteurs ont retrouvé une expression importante d'ARNm au niveau de CT isolés (Ugele et al. 2003; Serrano et al. 2007)

Concernant OATP1A2/SLCO1A2 (OATP-A), Loubiere et coll. ont mis en évidence sa présence aussi bien sur le plan transcriptionnel que protéique, et ce dans les CT (Loubiere et al. 2010; Briz et al. 2003). L'expression d'OATP1A2 semblait augmenter en milieu de grossesse pour retrouver un niveau similaire au premier trimestre et en fin de grossesse (Loubiere et al. 2010).

L'ARNm de SLCO3A1/OATP3A1 (OATP-D) a été retrouvé de façon importante aussi bien dans du tissu placentaire total à terme ou non, que sur des CT isolés ou en culture (Ugele et al. 2003). Son expression transcriptionnelle diminuerait avec le terme de la grossesse (Patel et al. 2003).

Concernant OATP1B1/SLCO1B1 (OATP-C), son ARNm a été retrouvé sur des CT (Briz et al. 2003), sans documentation de présence protéique en western Blot ni en immunohistochimie.

L'ARNm d'OATP1B3/SLCO1B3 (OATP-8) a été retrouvé dans des CT isolés ou en culture (Briz et al. 2003; Serrano et al. 2007; Ugele et al. 2003). Les informations concernant la localisation protéique sont à notre connaissance inexistantes.

Concernant OATP4A1/SLCO4A1 (OATP-E), sa présence en ARNm, en western blot et en immunohistochimie au niveau du ST (surface apicale) a été décrite dans le placenta humain, son expression semblant diminuer en milieu de grossesse pour retrouver un niveau similaire en fin de grossesse et au début de grossesse (Loubiere et

al. 2010).

La localisation et le rôle des autres OATP placentaires ne sont pas clairement démontrés.

Il est à noter que la plupart de ces descriptions ont été réalisées à partir de modèles non purifiés, c'est-à-dire à partir de tissus totaux et non de cultures primaires purifiées de trophoblastes humains.

Organic anion transporters (OAT)

De nombreuses molécules endogènes et exogènes présentent une charge négative au pH physiologique après avoir été conjuguées avec un groupe sulfate, ou glucuronidées par des enzymes de phase II. En général, ces molécules ne peuvent passer le placenta par diffusion passive, et nécessitent ainsi un transporteur particulier afin de faciliter leur efflux vers le compartiment fœtal. Ainsi, les OAT appartiennent à la famille des SLC22, et sont divisés en OAT1 à OAT7 (Kusuhara and Sugiyama 2005; Monte et al. 2004). Les OAT transportent un large spectre de substrats endogènes mais aussi exogènes. Par exemple, ils peuvent prendre en charge des hormones stéroïdes, des nucléotides, des anions organiques (para-aminohippurate), des bêta-lactamines, des agents anti-cancéreux (Moss et al. 2011; Sekine, Miyazaki, and Endou 2006).

Dans le placenta humain, SLC22A11/OAT4 a été mis en évidence (ARNm et protéine en immunohistochimie) au niveau du CT et de la membrane basolatérale du ST (Ugele et al. 2003).

Quant à SLC10A6/SOAT (*sodium dependent organic anion transporter*), ce transporteur semble impliqué dans le passage transplacentaire des acides biliaires vers le compartiment maternel. Ce dernier semble présent dans le placenta humain puisqu'une équipe a documenté sa présence en ARNm dans du tissu placentaire humain, sans pour autant préciser sa localisation (Geyer et al. 2007).

Concernant les autres OAT, jusqu'à ce jour, il n'y a pas de données concernant leur présence éventuelle dans le placenta humain (Burckhardt 2012).

Organic cation transporters (OCT)

Certaines molécules organiques présentent une charge positive qui peut être permanente ou transitoire, rendant leur passage à travers les membranes biologiques difficile. Ainsi, certaines cellules expriment des transporteurs particuliers, permettant aux cations de traverser ces membranes, les OCT. De la même manière que les OAT, les OCT font également partie de la famille SLC22 (Jonker and Schinkel 2004). Les OCT sont divisés en deux groupes : les OCT1 à 3 qui transportent les cations de façon indépendante du pH, et les OCTN1 à 3 qui sont des transporteurs dépendants du gradient de protons (Gorboulev et al. 1997). Alors que les OCT assurent l'influx des cations organiques, les OCTN assurent quant à eux l'efflux des cations (Tamai et al. 2000).

Les OCT sont connus pour transporter des substrats cationiques tels que la créatinine, la dopamine, l'acétylcholine, la sérotonine, mais également des substances médicamenteuses telles que l'aciclovir, la metformine, la cimetidine, le vérapamil, la quinidine (Yabuuchi et al. 1999; Nakamura et al. 2010).

Concernant la présence des OCT dans le placenta humain, il ne semble pas exister de données concernant OCT1, hormis une présence potentielle d'ARNm dans l'adventice des vaisseaux placentaires, essentiellement des veines (Bottalico et al. 2004).

En revanche, les données semblent controversées concernant OCT2/SLC22A2. En effet, certains auteurs ne retrouvaient pas sa présence dans le placenta humain (Sata et al. 2005) alors que d'autres ont retrouvé l'ARNm correspondant (Gorboulev et al. 1997; Saito et al. 2011), notamment dans des vaisseaux placentaires (veines) (Bottalico et al. 2004). De manière intéressante, certains auteurs ont suggéré la possibilité d'une grande variabilité interindividuelle quant à l'expression de ce dernier (Saito et al. 2011).

Enfin, en ce qui concerne OCT3/SLC22A3, ce transporteur a été décrit comme présent dans le placenta humain par la mise en évidence d'ARNm (Sata et al. 2005). La même équipe a confirmé la présence de la protéine correspondante au niveau de la membrane basale des ST en utilisant un modèle de vésicule membranaire (Sata et al. 2005).

Concernant la présence des OCTN dans le placenta, les ARNm d'OCTN1/SLC22A4 ont été retrouvés dans le placenta humain à des taux faibles, mais sa localisation exacte est pour l'instant inconnue (Tamaï et al. 1997). Ces données ont été confirmées par la suite sans pour autant localiser précisément ce transporteur (Nishimura and Naito 2005). Ses substrats sont représentés par le vérapamil et la quinidine (Vahakangas and Myllynen 2009).

Concernant le transporteur OCTN2/SLC22A5, celui-ci a été précisément localisé au niveau du placenta humain. En effet, l'ARNm correspondant a été retrouvé dans des tissus placentaires tout au long de la grossesse et sa localisation protéique a été décrite en immunohistochimie sur le versant apical du ST (Grube et al. 2005). De plus, il est à noter que l'expression d'ARNm a été décrite comme augmentant dans des cultures de trophoblastes humains, corroborant les données de Grube et coll. (Richards, Hartman, and Handwerger 1994). Les substrats décrits d'OCTN2 sont représentés par la quinidine, le vérapamil, les bêta-lactamines et la L-carnitine (Vahakangas and Myllynen 2009).

Enfin, OCTN3 n'a pas à ce jour été retrouvé dans le placenta humain, mais uniquement chez la souris (Jacobsson et al. 2007).

Les monoamines transporters (MAT)

Cette famille de transporteurs de monoamines comprend 3 membres : NET (*norepinephrine transporter*), SERT (*serotonin transporter*) et DAT (*dopamine transporter*) et appartient à la classe des SLC6. Le rôle de ces transporteurs membranaires dépendants du Na^+/Cl^- est de réguler les concentrations extracellulaires de certains neurotransmetteurs fortement impliqués dans la physiologie de l'organisme, notamment au niveau du système nerveux central (Bottalico et al. 2004). SERT régule le transport de la sérotonine, tandis que NET prend en charge la norépinephrine, et DAT la dopamine (Bottalico et al. 2004). De manière intéressante, ces transporteurs ont également été décrits dans le placenta. En effet, Bottalico et coll. ont retrouvé l'ARNm de SERT et de NET au niveau des ST issus de placentas humains à terme, sans pour autant localiser la protéine (Bottalico et al. 2004). Une

autre équipe avait auparavant étudié la localisation de SERT par des études fonctionnelles d'influx sur des extraits de membranes apicales issues de placentas humains (Balkovetz et al. 1989). SERT se situerait ainsi au niveau de la bordure en brosse de la face apicale des ST (Balkovetz et al. 1989).

Concernant NET, son ARNm a été retrouvé dans les ST, et son activité fonctionnelle a été mise en évidence sur des bordures en brosse de ST isolées à partir de placentas à terme (Ramamoorthy et al. 1993).

Il ne semble pas y avoir de données concernant DAT dans le placenta humain.

Les transporteurs d'acides aminés

Les acides aminés, éléments essentiels de la synthèse protéique, sont pour la plupart d'entre eux de taille importante et neutres sur le plan électrique. Leur passage par diffusion passive est donc compromis du fait de ces propriétés physico-chimiques comme cela a pu être mis en évidence au niveau de la barrière hémato-encéphalique (Pardridge 1983). Ainsi, certains transporteurs sont nécessaires afin de permettre leur influx dans les cellules. Le système L (*lecithin preferring*) permet le transport des acides aminés de taille importante. Le principal acteur du système L est le transporteur SLC7A5/LAT1 (Park et al. 2005). Son action est permise par sa liaison avec SLC3A2, qui peut individuellement transporter d'autres acides aminés (Nakamura et al. 1999).

Un système A existe également, représenté par SLC38A2/ATA2. Ce dernier est chargé de transporter des acides aminés non essentiels, de petite taille (Betz and Goldstein 1978).

D'autres systèmes existent comme par exemple le système N, représenté par le transporteur dépendant du Na^+ , SLC38A5/SNAT5 qui prend en charge les acides aminés riches en azote (Redzic 2011).

En plus d'assurer le transport de nombreux acides aminés essentiels ou non, l'ensemble de ces transporteurs permet de prendre en charge des molécules médicamenteuses diverses comme par exemple le baclofène, le melphalan, la gabapentine (del Amo, Urtti, and Yliperttula 2008; Torrents et al. 1998).

Concernant l'expression placentaire de ces transporteurs d'acides aminés, SLC7A5/LAT1 a été récemment décrit dans le placenta humain, avec des taux d'ARNm croissants avec le terme de la grossesse (Loubiere et al. 2010). Sa localisation a été déterminée par immunohistochimie sur la face apicale des ST humains (Okamoto et al. 2002).

SLC38A2/ATA2/SNAT2 a été détecté dans un modèle purifié de culture primaire de trophoblastes humains, aussi bien sur le plan transcriptionnel que protéique (Jones, Jansson, and Powell 2009). Concernant sa localisation, Champion et coll. ont détecté la protéine SNAT2 sur la face apicale du ST par immunohistochimie (Champion et al. 2004).

Concernant SLC38A5/SNAT5, il n'y a à notre connaissance qu'une seule publication mentionnant la présence de l'ARNm correspondant, et ce, sur un modèle de tissu placentaire total, et donc discutable (Nishimura and Naito 2005).

Les monocarboxylate transporters (MCT)

Les transporteurs de monocarboxylate (MCT) appartiennent à la famille des SLC16 et comportent 14 membres qui diffèrent selon leurs affinités/spécificités aux différents substrats (Halestrap and Meredith 2004). MCT1 à MCT4 sont des transporteurs couplés aux protons dont le rôle a été clairement établi, notamment pour le transport des monocarboxylates tels que le lactate, pyruvate et les corps cétoniques. Le transport du lactate à travers les membranes biologiques est en particulier fondamental pour le métabolisme cellulaire et la régulation du pH cellulaire, effluant le lactate issu de la glycolyse et influant ce même lactate qui pourra servir à la néoglucogenèse (cycle de Cori) (Halestrap and Meredith 2004). MCT5 à MCT7 n'ont pas à ce jour de substrat clairement défini. En revanche, MCT8/SLC16A2 et MCT10/SLC16A10 ont comme substrats des hormones thyroïdiennes (T3, T4) (Loubiere et al. 2010).

Concernant la présence des MCT dans le placenta :

La présence de MCT1/SLC16A1 et de MCT4/SLC16A3 a été décrite dans le placenta

humain en utilisant des vésicules de membranes placentaires (Settle et al. 2004). L'ARNm de ces deux transporteurs a été retrouvé ainsi que la protéine correspondante. MCT1 serait situé au niveau de la face basale du ST, alors que MCT4 serait situé sur le versant basal et apical du ST (Settle et al. 2004).

Concernant MCT5/SLC16A4, son expression protéique à des taux importants a été décrite dans le placenta, mais sa localisation est pour l'heure inconnue (Price, Jackson, and Halestrap 1998).

La présence d'ARNm correspondant au transporteur MCT8/SLC16A2 a été décrite dans le placenta humain (tissu placentaire total), ainsi que sa protéine (Loubiere et al. 2010). L'expression de MCT8/SLC16A2 a d'ailleurs la particularité d'augmenter durant la grossesse aussi bien sur le plan transcriptionnel que protéique (Loubiere et al. 2010). Ce transporteur a été décrit comme présent au niveau du versant apical du ST (Chan et al. 2006) mais aussi du CT (Chan et al. 2006; Loubiere et al. 2010).

L'expression de MCT10/SLC16A10 dans le placenta humain est maintenant bien établie. En effet, récemment encore, une équipe a non seulement mis en évidence sa présence en ARNm, mais aussi au niveau protéique par western blot et en immunohistochimie (localisation sur la face apicale du ST mais également au niveau du CT) (Loubiere et al. 2010). De manière intéressante, l'expression d'ARNm de MCT10 semble croître avec le terme de la grossesse (Loubiere et al. 2010).

Les transporteurs de glucose

Le glucose représente une source d'énergie essentielle pour les cellules, d'autant plus dans le cadre de la grossesse avec une attention toute particulière pour le fœtus (Baumann, Deborde, and Illsley 2002). Le glucose traverse la barrière placentaire par diffusion passive, mais la limite de transfert est atteinte rapidement, ce qui implique la présence de transporteurs permettant une diffusion facilitée. Cette famille de transporteurs appelée GLUT (*GLU*cose *T*ransporter) comprend 14 isoformes (GLUT1-14) (Gao et al. 2012), avec une prédominance nette de SLC2A1/GLUT1 dans le trophoblaste humain (Baumann, Deborde, and Illsley 2002).

Les principales GLUT transportent essentiellement du glucose, galactose, mannose,

fructose et autres hexoses (Uldry and Thorens 2004).

Dans le placenta humain, les données concernant GLUT1 sont les plus nombreuses et concordent entre elles, avec une expression d'ARNm importante, aussi bien dans des tissus placentaires totaux (Hauguel-de Mouzon et al. 1994) que dans des modèles de cultures primaires trophoblastiques (Hauguel-de Mouzon et al. 1994; Clarson et al. 1997). Les études *in situ* ont montré une expression volontiers syncytiotrophoblastique de GLUT1 aussi bien sur le versant basal qu'apical (Jansson, Wennergren, and Illsley 1993; Barros, Yudilevich, Jarvis, Beaumont, and Baldwin 1995). Très récemment, une équipe a également montré une expression de GLUT1 au niveau du CT (Gao et al. 2012).

Concernant GLUT3, son expression protéique semble limitée au ST, avec une possible localisation sur la face apicale de celui-ci (Gao et al. 2012; Ericsson et al. 2005). Son expression d'ARNm diminuerait pendant la grossesse (Sakata et al. 1995). Concernant GLUT4, la protéine serait exprimée au niveau du cytosol du ST sur les études d'immunohistochimie (Ericsson et al. 2005). De manière intéressante, son expression d'ARNm est intense au premier trimestre de la grossesse puis diminue significativement en fin de grossesse (Ericsson et al. 2005).

Enfin, concernant GLUT12, son expression transcriptionnelle a été démontrée sur des tissus placentaires humains totaux. Son expression protéique a également été décrite avec une localisation plutôt syncytiotrophoblastique, et plutôt cytoplasmique que membranaire (Gude et al. 2003).

Une publication récente retrouve une expression protéique de GLUT9 au niveau des faces basale et apicale du ST en western Blot et en immunohistochimie (Bibee, Illsley, and Moley 2011).

Des auteurs ont retrouvé une expression d'ARNm de GLUT10 sur une banque de tissus placentaires (Dawson, Baudequin, and O'Riordan 2011). Il n'y a en revanche aucune donnée sur l'expression protéique de GLUT10.

Des résultats similaires ont été décrit pour GLUT11 en utilisant des techniques identiques sans exploration de l'expression protéique (Scheepers et al. 2005).

Les peptide transporters (PT)

Les transporteurs d'acides aminés vus précédemment ne sont pas en mesure de prendre en charge des peptides. Ces derniers sont ainsi pris en charge par des transporteurs spécifiques : les transporteurs de peptides, appartenant à la famille SLC15. Quatre PT dépendant des protons sont décrits : SLC15A1/PEPT1, SLC15A2/PEPT2, SLC15A3/PHT2 et SLC15A4/PHT1 (Herrera-Ruiz and Knipp 2003; Daniel and Kottra 2004).

Hormis les peptides issus de l'hydrolyse enzymatique des protéines alimentaires, de nombreuses substances médicamenteuses sont transportées par les PT. Ainsi, les antiviraux, les bêta-lactamines, les inhibiteurs de l'enzyme de conversion sont pris en charge par ce type de transporteurs (Ganapathy et al. 1995; Shu et al. 2001; Ogihara et al. 2009; Guo et al. 1999).

Dans le placenta humain, les données sont peu nombreuses :

La présence de SLC15A1/PEPT1 a été décrite à plusieurs reprises. En effet, deux équipes ont retrouvé des taux faibles d'ARNm dans des extraits de tissus placentaires humains (Liang et al. 1995; Nishimura and Naito 2005) Il ne semble pas exister de données concernant l'expression protéique trophoblastique de ce transporteur.

Concernant SLC15A3/PHT2, une expression d'ARNm importante a été retrouvée sur une banque de tissus placentaires, sans recherche de la protéine correspondante (Botka et al. 2000).

Concernant SLC15A2/PEPT2 et SLC15A4/PHT1, il n'y a pas à notre connaissance de donnée disponible sur le placenta humain.

Concentrative nucleoside transporters (CNT)

Les acides nucléiques, ADN et ARN, jouent un rôle crucial dans les cellules. Ces mêmes acides nucléiques sont constitués à partir d'esters phosphoriques de nucléosides. Ces nucléosides sont divisés en deux familles ; les purines qui incluent l'adénosine et la guanosine, et les pyrimidines qui incluent la cytosine, l'uridine et la thymidine (Gray, Owen, and Giacomini 2004).

La plupart des cellules sont aptes à fabriquer des nucléosides *de novo*, cependant

certaines d'entre elles en sont incapables et nécessitent l'influx de nucléosides extracellulaires afin de maintenir leur métabolisme (Fox and Kelley 1978). Ce transport de nucléosides est ainsi assuré par une famille de SLC dépendant du sodium (SLC28) et une autre famille de SLC indépendante du sodium (SLC29) qui ne fait pas partie des CNT mais des ENT (cf. *infra*).

Les CNT incluent 3 membres (CNT1-3/SLC28A1-3) avec des substrats différents. CNT1 assure le transport des pyrimidines et de l'adénosine, CNT2 transporte les purines et l'uridine et CNT3 prend en charge les pyrimidines et les purines (Gray, Owen, and Giacomini 2004).

En plus des nucléosides, les CNT transportent tout un ensemble de substances médicamenteuses. Par exemple, CNT1 prend en charge des molécules ressemblant aux nucléosides comme la zidovudine, la cytarabine, la gemcitabine, la lamivudine (Graham et al. 2000). CNT2 transporte des molécules à visée antivirale comme la ribavirine et la didanosine (Gray, Owen, and Giacomini 2004). Enfin, CNT3 intervient dans le transport de certains anticancéreux ou antiviraux comme la gemcitabine, le 5-FU, la fludarabine, la zidovudine, la didanosine (Ritzel et al. 2001).

Dans le placenta humain, concernant SLC28A1/CNT1, une seule équipe a démontré la présence d'ARNm dans des extraits de placenta humain, sans documentation sur la localisation exacte (Nishimura and Naito 2005).

Il n'y a pas de donnée disponible relatant une éventuelle présence de SLC28A2/CNT2 dans le placenta humain.

Enfin, concernant SLC28A3/CNT3, deux équipes ont retrouvé des taux modestes d'ARNm sur des extraits de placenta humain (Ritzel et al. 2001; Nishimura and Naito 2005). Ces résultats n'ont pas été confirmés par la suite.

Equilibrative nucleoside transporters (ENT)

Comme mentionné plus haut, les nucléosides peuvent être pris en charge par une famille de SLC indépendants du sodium : SLC29 ou ENT. Ces ENT sont représentés par 4 isoformes qui peuvent transporter ces nucléosides de façon bidirectionnelle, ou unidirectionnelle (influx ou efflux) (Baldwin et al. 2004).

L'adénosine est le substrat le plus efficacement transporté par ces 4 isoformes d'ENT, même si d'autres nucléosides peuvent être pris en charge par ces derniers (Baldwin et al. 2004). Par ailleurs, d'autres substrats exogènes sont également transportés par les ENT comme la cladribine et la cytarabine pour ENT1 (Pastor-Anglada, Felipe, and Casado 1998), et la zidovudine, la zalcitabine et la didanosine pour ENT2 et ENT3 (Baldwin et al. 2004; Yao et al. 2001; Crawford et al. 1998). Enfin, ENT4 semble plus enclin à transporter des substances endogènes comme la dopamine, la sérotonine et la norépinephrine dans le cerveau notamment (Engel, Zhou, and Wang 2004).

Dans le placenta humain, la protéine SLC29A1/ENT1 semble avoir été retrouvée sur la face apicale des ST humains, à des taux faibles (Barros, Yudilevich, Jarvis, Beaumont, Young, et al. 1995).

Concernant SLC29A2/ENT2, la protéine a été retrouvée au niveau du placenta humain à des taux faibles mais sa localisation n'est pas déterminée à ce jour (Barros, Yudilevich, Jarvis, Beaumont, Young, et al. 1995). Aucune autre étude ne corrobore les données obtenues pour ENT1 et ENT2.

Concernant SLC29A3/ENT3, des ARNm ont été retrouvés avec un signal fort dans un extrait de tissu placentaire total (Nishimura and Naito 2005), mais aussi sur des banques d'ADNc (Baldwin et al. 2005). La protéine n'a pas été détectée à ce jour dans le trophoblaste humain.

Il n'y a pas à notre connaissance d'expression décrite de SLC29A4/ENT4 dans le placenta humain, hormis Nishimura et coll. qui retrouve une expression infime d'ARNm sur du tissu placentaire total (Nishimura and Naito 2005).

Transporteur/alias (gène)	Substrats	Localisation	Expression placentaire			Références
			Lignée cancéreuse	Placenta total	Culture primaire ou cellules trophoblastiques isolées	
GLUT1 (SLC2A1)	Glucose, galactose, mannose, glucosamine	Ubiquitaire	+	+	+	(Uldry et al. 2004; Nishimura et al. 2005; Hauguel-de Mouzon et al. 1994; Clarson et al. 1997; Gao et al. 2012; Jansson et al. 1993; Barros et al. 1995; Shah et al. 1999)
GLUT2 (SLC2A2)	Glucose, fructose, galactose, mannose	Foie, pancréas, intestin, rein, cerveau	-	-	-	(Uldry et al. 2004)
GLUT3 (SLC2A3)	Glucose, acide déhydroascorbique, 2-déoxy-D-glucose, mannose, galactose, maltose, xylose	Cerveau, sperme, embryon	+	+	+	(Uldry et al. 2004; Nishimura et al. 2005; Ericsson et al. 2005; Sakata et al. 1995; Gao et al. 2012; Brown et al. 2011)
D2H/ATRI (SLC3A1)	L-arginine, L-cystine, L-leucine	Foie	-	-	-	(Pineda et al. 2004)

4F2/CD98 (SLC3A2)	Valine, leucine, isoleucine, tryptophane, tyrosine	Cerveau	-	+	-	(Boado et al. 1999; Nishimura et al. 2005)
NAGT/SGLT1 (SLC5A1)	Glucose, galactose	Cœur, trachée, prostate	-	+	-	(Turk et al. 1997; Nishimura et al. 2005)
LAT1/E16 (SLC7A5)	L-dopa, hormones thyroïdiennes, melphalan, baclofène, gabapentine, alpha-méthyl-dopa	Muscle, cerveau, rein, foie, poumon, rate	+	+	-	(Loubiere et al. 2010; del Amo et al. 2008; Nishimura et al. 2005; Okamoto et al. 2002)
LAT-2/y⁺ LAT-2 (SLC7A6)	L-leucine, L-arginine, glutamine	Rein, cerveau, foie, rate, muscle, cœur, intestin, poumon, testicule	-	+	-	(Torrents et al. 1998; Nishimura et al. 2005; Cleal et al. 2011)
y⁺ LAT-2/LPI (SLC7A7)	L-leucine, L-arginine, hormones thyroïdiennes	Rein, intestin, rate, poumon	-	+	-	(Mathieu et al. 2002; Torrents et al. 1998; Nishimura et al. 2005)
LAT2/LPI-PCI (SLC7A8)	Phénylalanine, tyrosine, leucine, arginine and tryptophane, L-dopa, hormones thyroïdiennes, melphalan, baclofène, gapapentine, alpha-méthyl-dopa	Cœur, cerveau, rein, rate, prostate, testicule, ovaire, intestin, poumon	+	+	-	(Loubiere et al. 2010; del Amo et al. 2008; Hyde et al. 2003; Nishimura et al. 2005; Jones et al. 2006)
CSNU3 (SLC7A9)	Arginine, ornithine, alanine, leucine or isoleucine	Rein, foie, intestin	-	+	-	(Closs et al. 2004; Reig et al. 2002; Nishimura et al. 2005)
xCT/CCBR1 (SLC7A11)	Cystine, glutamate	Cerveau, foie, macrophage, rétine	-	+	-	(Huang et al. 2005; Nishimura et al. 2005)

NTCP/NTCP1 (SLC10A1)	Na ⁺ /taurocholate-cotransporting Polypeptide	Foie, pancréas	-	+	+	(Geyer et al. 2007; Nishimura et al. 2005; Ugele et al. 2003)
SOAT (SLC10A6)	Hormones stéroïdes sulfo- conjuguées, acide tauroolithocholique, pyrènes sulfo- conjugués, acides biliaires	Testicule, pancréas, surrénale	-	+	-	(Geyer et al. 2007)
PEPT1/HPECT1 (SLC15A1)	Oseltamivir, valaciclovir, amoxicilline, céphalexine	Intestin, rein, foie	-	+	-	(Ogihara et al. 2009, Guo et al. 1999, Li et al. 2006, Watanabe et al. 2004; Nishimura et al. 2005; Liang et al. 1995)
PEPT2/ FLJ33407 (SLC15A2)	Amino-béta-lactamines, captopril, énalapril, fosinopril	Rein, cerveau, poumon, sein, rate	-	+	-	(Dantzig et al. 1997; Ganapathy et al. 1995; Shu et al. 2001; Zhu et al. 2000; Nishimura et al. 2005)
MCT1 (SLC16A1)	Lactate, pyruvate, corps cétoniques	Ubiquitaire sauf pancréas	-	+ (vésicule membranaire)	-	(Lean et al.2009, Halestrap et al. 2013; Settle et al. 2004)
MCT8 (SLC16A2)	Hormones thyroïdiennes	Ubiquitaire	-	+	+	(Kinne et al. 2010; Halestrap et al. 2013; Loubiere et al. 2010; Vasilopoulou et al. 2010; Chan et al. 2006)

MCT3/MCT4 (SLC16A3)	Lactate, pyruvate, lovastatine	Muscle, chondrocytes, leucocytes, testicules, poumon, ovaire, cœur	-	+	(vésicule membranaire)	-	(Wang et al. 2007; Nagasawa et al. 2002; Halestrap et al. 2013; Settle et al. 2004)
RFCl (SLC19A1)	N ⁵ -Methyltetrahydrofolate	Ubiquitaire	+	+		-	(Ganapathy et al. 2004; Solanky et al. 2010; Yasuda et al. 2008; Yasuda, et al. 2008b)
TRMA/THTI (SLC19A2)	Thiamine	Ubiquitaire	+	-		-	(Ganapathy et al. 2004; Keating et al. 2006)
THTR2 (SLC19A3)	Thiamine	Ubiquitaire	+	+		-	(Ganapathy et al. 2004; Keating et al. 2006; Eudy et al. 2000)
OCT1/hOCT1 (SLC22A1)	Metformine, aciclovir, ganciclovir, désipramine, sérotonine, prostaglandine E2	Foie, intestin, rein, poumon, muscle, cerveau, tissu adipeux	-	+		-	(Koeppell et al. 2004; Nishimura et al. 2005; Ahmadioghaddam et al. 2013)
hOCT3/hEMT (SLC22A3)	Guanidine, dopamine, norépinephrine, histamine	Cœur, muscle, cerveau, intestin, foie, poumon, rein, vessie, peau, sein	-	+		-	(Grundemann et al. 1998; Kekuda et al. 1998; Wu et al. 1998; Nishimura et al. 2005; Koeppell et al. 2004; Ahmadioghaddam et al. 2013; Martel et al. 2003)

OCTN1 (SLC22A4)	Vérapamil, quinine, ipratropium	Rein, intestin, rate, cœur, muscle, cerveau, glande mammaire, thymus, prostate, sperme	-	+	-	(Yabuuchi et al. 1999; Nakamura et al. 2010; Nishimura et al. 2005; Koepsell et al. 2004; Tamai et al. 1997)
OCTN2/CDSP (SLC22A5)	Ipratropium, quinine, vérapamil, carnitine	Rein, cœur, muscle, prostate, poumon, pancréas, thyroïde, foie	+	+	+	(Nakamura et al. 2010; Nishimura and Naito 2005; Grube et al. 2005; Koepsell et al. 2004)
OAT1/PAHT (SLC22A6)	Acide dicarboxylique (glutarate, ketoglutarate), para-aminohippurate (PAH), nucléotides cycliques, bêta- lactamines, antiviraux, chimiothérapies, anti- inflammatoires non stéroïdiens	Rein, cerveau	-	+	-	(Sekine et al. 2006; Moss et al. 2011; Koepsell et al. 2004; Cha et al. 2000)
NLT/OAT2 (SLC22A7)	5-fluorouracile, paclitaxel, prostaglandine, tétracycline, zidovudine	Foie, rein	-	+	-	(Kobayashi et al. 2005; Babu et al. 2002; Takeda et al. 2002; Nishimura et al. 2005; Koepsell et al. 2004)
OAT4 (SLC22A9)	<i>Inconnu</i>	Foie	-	-	-	(Koepsell et al. 2004)

hOAT4 (SLC22A11)	Tétracycline, zidovudine, bumetanide, pravastatine, méthotrexate, prostaglandine, estrone	Rein	+	+	+	(Moss et al. 2011; Babu et al. 2002.; Takeda et al. 2002; Takeda et al. 2002b; Nishimura et al.2005; Koepsell et al. 2004; Ugele et al. 2003; Zhou et al. 2008; Cha et al. 2000)
(SLC25A13)	Aspartate, glutamate	Pancréas, rein, foie, cœur, muscle, cerveau	-	-	-	(Säheki et al. 2002; Palmieri et al. 2013)
CNT1/HCNT1 (SLC28A1)	Nucléosides, ribavirine, zidovudine	Foie, rein, intestin	-	+	-	(Genter et al. 2010; Endres et al. 2009; Nishimura et al. 2005)
CNT2/HCNT2 (SLC28A2)	Nucléosides, didanosine, ribavirine, analogues nucléosidiques	Rein, foie, cœur, cerveau, pancréas, muscle, intestin	-	+	-	(Ritzel et al. 1998; Patil et al. 1998; Lang et al. 2001; Nishimura et al. 2005)
CNT3/HCNT3 (SLC28A3)	Nucléosides, gemcitabine, cladribine, 5-fluorouracile, fludarabine, zébularine	Pancréas, moelle osseuse, glande mammaire, intestin, poumon, prostate, testicule, foie	-	+	-	(Gray et al. 2004; Ritzel et al. 2001; Nishimura et al. 2005)
ENT1 (SLC29A1)	Nucléosides, cytarabine, gemcitabine, fludarabine	Ubiquitaire	+	+	-	(Huang et al. 2004; Giovannetti et al. 2006; Zhang et al. 2007; Nishimura et al. 2005; Barros et al. 1995; Mani et al. 1998)

ENT2/DER12 (SLC29A2)	Antirétroviraux (2'3'- dideoxyinosine) (ddI), AZT, ddC	Ubiquitaire	+	+	-	(Shu et al. 2001; Yao et al. 2001; Nishimura et al. 2005; Mani et al. 1998; Barros et al. 1995)
CTRI (SLC31A1)	Cuivre, cisplatine	Foie, intestin, cœur, rein	+	+	-	(Ishida et al. 2002; Hardman et al. 2006)
ATA2/ SNAT2 (SLC38A2)	Glutamine, alanine, serine, proline, histidine, glycine, asparagine, cystéine	Ubiquitaire	+	+	+	(Mackenzie et al. 2004; Tan et al. 2011; Tani et al. 2007; Nishimura et al. 2005; Jones et al. 2009; Mando et al. 2013; Jones et al. 2006)
SN2/JM24 (SLC38A5)	Serine, alanine, glycine, glutamine, asparagine, histidine	Estomac, cerveau, foie, poumon, intestin, rate, rein	-	+	-	(Nakanishi et al. 2001; Nishimura et al. 2005)
OATP1A2 (SLCO1A2)	Thyroxine, méthotrexate, imatinib, saquinavir, lévofloxacine	Cerveau, rein, foie, intestin	+	+	+	(Fujiwara et al. 2001; Badagnani et al. 2006; Hu et al. 2008; Su et al. 2004; Maeda et al. 2007; Serrano et al. 2007; Loubiere et al. 2010)
OATP2A1 (SLCO2A1)	Prostaglandine	Ubiquitaire	-	-	-	(Kanai et al. 1995; Chan et al. 1998)
OATP3A1 (SLCO3A1)	Estrogènes	Ubiquitaire	-	+	+	(Ugele et al. 2003)

OATP4A1 (SLCO4A1)	Hormones thyroïdiennes, stéroïdes, PGE2, benzy/pénicilline, sels biliaires	Ubiquitaire	-	+	-	(Loubiere et al. 2010; Hagenbuch 2007; Hagenbuch et al. 2003)
OATP2B1 (SLCO2B1)	Benzy/pénicilline, digoxine, pravastatine, rosuvastatine, fexofénadine, énalapril, déhydroépiandrosterédione	Foie, intestin, cœur, peau	+	+	+	(Kallioikoski et al. 2009; Serrano et al. 2007; Ugele et al. 2003; St-Pierre et al. 2002; Hagenbuch et al. 2004)

Abréviations

- + : présence décrite d'ARNm et/ou de protéines correspondant au gène étudié
- : absence d'ARNm et/ou de protéines correspondant au gène étudié ou absence de données

Tableau 2: Expression des principaux transporteurs membranaires de la famille des *Solute Carrier (SLC)* chez l'humain

2- Les transporteurs ATP-binding Cassette (ABC) (Tableau 3)

Il s'agit de la principale famille de protéines de transport membranaire. Les membres des ABC jouent pour la plupart un rôle de « pompes » d'efflux dépendantes de l'ATP pour un nombre varié et important de substrats dont la plupart sont de petites molécules (Dean and Annilo 2005). La classification de ces ABC permet de former des groupes basés sur des homologies de séquence d'acides aminés. A ce jour, il semble exister 48 membres d'ABC, classés en 7 sous-familles, de ABCA à ABCG. Ainsi, on retrouve 12 membres dans la famille ABCA (anciennement ABC1), 11 membres dans la famille ABCB (anciennement MDR/TAP), 12 membres dans la famille ABCC (anciennement MRP/CFTR), 4 membres pour ABCD (anciennement ALD), 1 membre pour ABCE (anciennement OABP), 3 membres pour ABCF (anciennement GCN20) et 5 membres pour ABCG (anciennement White) (Dean and Annilo 2005; Hennessy and Spiers 2007).

ABCB1/MDR1, P-glycoprotein (P-gp)

ABCB1/MDR1 a été le premier transporteur ABC à être découvert, et il est à ce jour le plus étudié de tous avec plus de 14500 entrées dans la base de données *Pubmed* (Ceckova-Novotna, Pavek, and Staud 2006). Il s'agit d'une glycoprotéine phosphorylée de 170 kDa (Evseenko, Paxton, and Keelan 2007), présentant deux domaines transmembranaires et deux sites de liaison à l'ATP, l'ensemble formant l'unité fonctionnelle de la P-gp. Ce transporteur représente le modèle classique de pompe d'efflux. En effet, celui-ci est en mesure de détecter les substrats passant la bicouche lipidique et de les extruder avant qu'ils n'atteignent le milieu intracellulaire (Gottesman and Pastan 1993).

La p-gp est exprimée de façon importante dans le rein (tube contourné proximal), dans l'intestin grêle, dans la barrière hémato-encéphalique, dans la barrière hémato-testiculaire et dans le placenta (Ho and Kim 2005). Le rôle de la P-gp est donc très important lorsque l'on s'intéresse au passage d'une barrière biologique par des médicaments, *a fortiori* pendant la grossesse car la P-gp serait en mesure de protéger

le fœtus de certains xénobiotiques.

Le nombre de ses substrats est très important mais aussi celui des substances qui sont en mesure d'inhiber son activité. On compte parmi ses substrats de nombreuses molécules anti-cancéreuses comme les taxanes, la daunorubicine, la vinblastine, la vincristine, des antibiotiques comme le triméthoprim, la clarythromycine, la lévofloxacine, des antalgiques comme la morphine, des anticonvulsivants, des antiviraux, etc. (Takano, Yumoto, and Murakami 2006).

Les inhibiteurs sont aussi très nombreux, on y trouve des antiviraux, des inhibiteurs de la pompe à protons, des statines, des anticancéreux, des antifongiques, des antibiotiques, etc. (Takano, Yumoto, and Murakami 2006).

Dans le placenta humain, les données disponibles sont nombreuses concernant l'expression d'ABCB1/P-gp. L'ARNm d'ABCB1 semble très exprimé dans le placenta en début de grossesse, puis de moins en moins tout au long de la grossesse (Sun et al. 2006). Cette expression d'ARNm a été retrouvée sur des CT en culture et ce, tout au long de la différenciation cellulaire (Atkinson et al. 2003). L'expression protéique de P-gp évolue de manière similaire en déclinant tout au long de la grossesse (Gil et al. 2005; Sun et al. 2006).

Concernant la localisation de P-gp, les données disponibles convergent dans le même sens puisqu'elle se situerait majoritairement au niveau de la face apicale du ST, les données venant de membranes issues de placentas totaux et de CT isolés (Atkinson et al. 2003).

ABCB4/MDR3

ABCB4/MDR3 est une protéine transmembranaire de 170 kDa très proche sur le plan structurel de ABCB1/P-gp. Elle est essentiellement localisée au niveau du foie (Serrano et al. 2007), mais elle est également présente au niveau du placenta humain. En effet, l'ARNm de ABCB4 a été retrouvé sur des trophoblastes en culture et également sur des tissus placentaires totaux de 1^{er} et 3^{ème} trimestres en notant une augmentation significative avec le terme (Patel et al. 2003). A l'opposé, d'autres auteurs ont rapporté des taux d'ARNm d'ABCB4 à peine détectables lorsqu'il

s'agissait de CT isolés (Serrano et al. 2007).

Quant à la protéine MDR3, celle-ci a été retrouvée sur le versant basal des ST en western Blot (Evseenko, Paxton, and Keelan 2007).

ABCC1/MRP (multidrug resistance-associated protein)1

ABCC1/MRP1 fut le premier transporteur de la famille des ABCC/MRP à être découvert. Comme la P-gp, ABCC1 a de nombreux substrats, très variés comme le paclitaxel, le méthotrexate, le cyclophosphamide, la doxorubicine, la vinblastine, etc. (Sissung et al. 2010; Cole et al. 1992). La différence majeure concernant la spécificité du substrat entre les ABCC et la P-gp est la capacité des MRP à transporter activement les hormones stéroïdes et des composés exogènes en plus des molécules mères. Il a été suggéré que la fonction physiologique des MRP dans le placenta serait d'éliminer les substances issues du catabolisme fœtal (Leslie, Deeley, and Cole 2005). ABCC1/MRP1 est présent dans de nombreux tissus tels que le cerveau, l'intestin, le rein, la barrière hémato-testiculaire, le placenta, etc. (Kis et al. 2010).

Dans le placenta humain, l'ARNm de ABCC1/MRP1 est retrouvé significativement dans des CT en culture ou isolés (Atkinson et al. 2003; Serrano et al. 2007).

Concernant l'expression protéique, celle-ci est préférentiellement située au niveau du versant basal du ST, aussi bien en western blot qu'en immunohistochimie (Atkinson et al. 2003).

ABCC2-3/MRP2-3

Comme d'autres MRP, ABCC2/MRP2 est impliqué dans l'efflux de nombreuses substances organiques, qui sont principalement conjuguées avec du glutathion, du glucuronate ou du sulfate.

L'expression de MRP2 dans le placenta humain a été retrouvée constamment dans les différents articles. L'ARNm a été retrouvé aussi bien au premier trimestre qu'au troisième trimestre de la grossesse, avec une augmentation en fin de grossesse (Wang et al. 2007; Meyer zu Schwabedissen, Jedlitschky, et al. 2005). L'ARNm

d'ABCC2/MRP2 a également été retrouvé sur des CT isolés de placentas à terme (Serrano et al. 2007), mais également sur des CT en culture avec une augmentation du signal du signal d'ARNm au 2^{ème} jour de culture (Meyer zu Schwabedissen, Jedlitschky, et al. 2005). La protéine MRP2 quant à elle a été retrouvée en immunohistochimie au niveau du versant apical du ST (St-Pierre et al. 2000; Meyer zu Schwabedissen, Jedlitschky, et al. 2005). Certains auteurs estiment qu'ABCC2 aurait un rôle plus important dans le transport médicamenteux qu'ABCC1 compte tenu de son expression croissante au cours de la grossesse (Vahakangas and Myllynen 2009).

Concernant ABCC3/MRP3, l'ARNm a été retrouvé dans les CT isolés de placentas à terme (Serrano et al. 2007). Son expression protéique est essentiellement syncytiotrophoblastique et bien qu'elle soit retrouvée sur la face apicale du ST (Wang et al. 2007), son expression majoritaire semble située sur sa face basale, à l'instar de MRP1 (Evseenko, Paxton, and Keelan 2007; Wang et al. 2007).

ABCC4-5/MRP5-5

Concernant ABCC4/MRP4, l'ARNm a été retrouvé à des taux faibles sur des CT isolés (Serrano et al. 2007). En revanche, il n'existe pas à notre connaissance de données concernant la localisation de la protéine MRP4 au niveau du trophoblaste humain (Prouillac and Lecoœur 2010).

L'ARNm d'ABCC5/MRP5 a en revanche été retrouvé à des taux importants notamment au premier trimestre de la grossesse, avec une baisse significative au cours du terme (Meyer Zu Schwabedissen, Grube, et al. 2005). La protéine MRP5 a été localisée en immunohistochimie sur le versant basal du ST (Meyer Zu Schwabedissen, Grube, et al. 2005).

ABCC6-10-12/MRP6-7-9

Il n'y a pas de données à notre connaissance concernant ABCC6/MRP6, ABCC10/MRP7 ni ABCC12/MRP9 dans le placenta humain, hormis une équipe ayant mis en évidence des taux très faibles d'ARNm dans des extraits de placentas totaux (Nishimura and Naito 2005).

ABCG2/BCRP

ABCG2, autrement appelée dans la littérature BCRP pour *Breast Cancer Resistance Protein*, ou *Mitoxantrone Resistance Protein* (MXR) ou encore *Placenta-specific ABC Transporter* (ABCP), a été isolée pour la première fois en 1998 à partir d'une lignée cancéreuse MCF-7. Il s'agit d'un transporteur de 75 kDa, très étudié dans la littérature et dans un grand nombre d'organes, très fortement exprimé dans le placenta et ce, en comparaison avec les différents tissus (intestins, reins, système nerveux, etc.) (Maliapaard et al. 2001).

ABCG2/BCRP est en charge de transporter un large spectre de substrats, allant des agents anticancéreux, aux anions organiques, en passant par des médicaments utilisés pendant la grossesse tels que la nitrofurantoïne ou la cimétidine (Merino et al. 2005; Pavék et al. 2005), tout en alliant des fonctions alternatives telles que la protection cellulaire contre l'hypoxie (Sarkadi et al. 2004). ABCG2 pourrait ainsi jouer un rôle de protection des cellules placentaires, en les protégeant notamment de l'apoptose induite par le TNF α (Evseenko, Paxton, and Keelan 2007).

Il est intéressant de noter que les substrats pris en charge par ABCG2 englobent une partie de ceux pris en charge par certains transporteurs ABC tels que ABCB1/P-gp ou ABCC2/MRP2. Ainsi, de la même manière que ABCB1/P-gp, BCRP protégerait le fœtus de certains xénobiotiques en les effluant vers le secteur maternel.

Les données concernant l'expression d'ABCG2/BCRP pendant la grossesse sont controversées. D'une part, certains auteurs ne mettent pas en évidence de variation du taux d'ARNm d'ABCG2 durant la grossesse avec cependant des taux importants tout au long de celle-ci (Yeboah et al. 2006). Concernant l'expression protéique, sur des résultats issus de western blots, BCRP semblait être de plus en plus exprimée tout au

long de la gestation (Yeboah et al. 2006). D'autre part, d'autres équipes ont retrouvé une expression transcriptionnelle et protéique deux fois plus importante en début de grossesse qu'à la fin de celle-ci (Meyer zu Schwabedissen et al. 2006). Enfin, une autre équipe a mis en évidence des taux d'ARNm et de protéines BCRP inchangés durant toute la grossesse (Mathias, Hitti, and Unadkat 2005).

En revanche, la BCRP semble localisée essentiellement sur la face apicale du ST (Maliepaard et al. 2001; Yeboah et al. 2006).

TAP (transporter associated with antigen processing)/ABCB2-ABCB3

TAP/ABCB2-3 est une protéine (deux hétérodimères de TAP1 et TAP2) présente au niveau du réticulum endoplasmique qui permet au peptide antigénique de passer du cytosol au réticulum avant que ce même peptide gagne ensuite la membrane cellulaire pour intégrer le complexe majeur d'histocompatibilité (Procko et al. 2009). Il s'agit donc d'un transporteur de peptide faisant partie de la famille des transporteurs ABC (Procko et al. 2009).

La liste de ses substrats médicamenteux n'est pas connue à ce jour.

Dans le placenta humain à terme, TAP1 présente une expression d'ARNm faible dans le ST et une expression protéique faible également (Roby, Gershon, and Hunt 1996). Il ne semble pas y avoir d'autres données confirmant ces résultats.

ABCF1/ABC50

ABCF1 fait partie de la famille des transporteurs ABC et appartient à la sous-famille GCN20 (Klein, Sarkadi, and Varadi 1999). Cette protéine n'a pas de domaine transmembranaire et consiste en un complexe dimérique de type ABC-ABC (Klein, Sarkadi, and Varadi 1999). Cette particularité semble unique dans la famille des ABC (Klein, Sarkadi, and Varadi 1999).

ABCF1 joue vraisemblablement un rôle clé dans l'initiation du transport des ARN de transfert (ARNt) jusqu'aux ribosomes, et ce grâce à son association avec *l'eukaryotic initiation factor 2* via l'hydrolyse de GTP (guanosine triphosphate) (Tyzack et al.

2000).

Même si initialement, certains auteurs mettaient en doute la possibilité que ABCF1 soit un transporteur, très récemment une équipe a émis l'hypothèse qu'ABCF1 pourrait être impliqué dans des mécanismes de résistances aux chimiothérapies car son niveau d'expression était diminué chez les patients atteints d'un cancer colorectal non répondeurs à la chimiothérapie (Hlavata et al. 2012). A ce jour, il ne semble cependant pas qu'il y ait de substrat médicamenteux connu d'ABCF1.

Transporteur/alias (gène)	Substrats	Localisation	Expression placentaire			Références
			Lignée cancéreuse	Placenta total	Culture primaire ou cellules trophoblastiques isolées	
ABC1/TGD (ABCA1)	Cholestérol, phospholipides	Foie, cerveau	-	+	+	(Santamarina-Fojo et al. 2001 ; Baumann et al. 2013 ; Nikitina et al. 2011)
ABC2 (ABCA2)	<i>Low-density Lipoprotein</i> (LDL), stérols	Cerveau, macrophage, prostate, ovaire, utérus	-	+	-	(Mack et al. 2007 ; Nishimura et al. 2005)
ABC3/ABC-C (ABCA3)	Phosphatidylcholine, phosphatidylglycérol	Poumon, rein, surrénales, cerveau, foie, pancréas	-	+	-	(Ban et al. 2007 ; Nishimura et al. 2005)
ABCR/ RMP (ABCA4)	All-trans-rétinal aldéhyde (rétinylidène- phosphatidylethanolamine)	Cerveau	-	+	-	(Nishimura et al. 2005 ; Tsybovsky et al. 2010)
EST640918 (ABCA9)	Cholestérol	Ubiquitaire	-	+	-	(Nishimura et al. 2005 ; Pichler et al. 2002)
LI2/ICR2B (ABCA12)	Glucosylcéramide	Peau, estomac	-	+	-	(Nishimura et al. 2005 ; Thomas et al. 2009)

FLJ16398/ DKFZp313D2411 (ABCA13)	<i>Inconnu</i>	Trachée, testicule, moelle osseuse	-	-	-	(Prades et al. 2002)
P-gp /MDR1 (ABCB1)	Paclitaxel, docétaxel, doxorubicine, épirubicine, étoposide, vinblastine, vincristine, irinotecan, vérapamil, diltiazem, érythromycine, cyclosporine, cimétidine	Cerveau, intestin, rein, testicule,	+	+	+	(Nishimura et al. 2005; Jeiri 2012; Serrano et al. 2007; Wang et al. 2007; Schinkel et al. 2003; Gil et al. 2005; Sun et al. 2006; Atkinson et al. 2003)
TAP1 (ABCB2)	Pépides	Peau, foie, intestin	-	+	-	(Nishimura et al. 2005; Abele et al. 1999; Roby et al. 1996)
TAP2 (ABCB3)	Pépides	Ovaire, peau	-	+	-	(Nishimura et al. 2005; Abele et al. 1999; Auner et al. 2010; Heimerl et al. 2007)
MDR3/PGY3 (ABCB4)	Paclitaxel, vinblastine, digoxine, vérapamil	Cerveau, foie	+	+	+	(Nishimura et al. 2005; Giacomini et al. 2010; Patel et al. 2003; Serrano et al. 2007)
PRP/ABC14 (ABCB6)	Hème, protoporphyrines	Peau, ovaire	-	+	-	(Nishimura et al. 2005; Keller et al. 2007; Heimerl et al. 2007)
BSEP/SPGP (ABCB11)	Pravastatine, acides biliaires	Foie	+	+	+	(Hirano et al. 2005; Trauner et al. 2003; Patel et al. 2003)

MRP1/ABCC (ABCC1)	Méthotrexate, cyclophosphamide, paclitaxel, daunorubicine, doxorubicine, vinblastine, vincristine, irinotecan, melfhalan, chlorambucile	Ubiquitaire	+	+	+	(Nishimura et al. 2005; Sissung et al. 2010; Atkinson et al. 2003; Serrano et al. 2007; Wang et al. 2007; Schinkel et al. 2003; St-Pierre et al. 2000; Evseenko et al. 2006; Prouilliac et al. 2009; Pascolo et al. 2003)
MRP2/DJS (ABCC2)	Méthotrexate, doxorubicine, cisplatine, irinotecan, mitoxantrone, étoposide, vinblastine, vincristine	Foie, intestin, rein, peau	+	+	+	(Nishimura et al. 2005; Sissung et al. 2010; Heimerl et al. 2007; Meyer zu Schwabedissen et al. 2005; Serrano et al. 2007; Malepaard et al. 2001; Evseenko et al. 2006; Pascolo et al. 2003)
MRP3/MLP2 (ABCC3)	Méthotrexate, vincristine, étoposide, sels biliaires (cholate, taurocholate, glycocholate), glutathion	Foie, intestin, rein	+	+	+	(Nishimura et al. 2005; Deeley et al. 2006; Wall et al. 2003; Serrano et al. 2007; Wang et al. 2007; Schinkel et al. 2003; Pascolo et al. 2003)

MRP4/MOATB (ABCC4)	Méthotrexate, topotecan, irinotecan, adéfovir, ténofovir, furosemide, cyclic AMP, cyclic GMP, acides biliaires	Prostate, poumon, muscle, pancréas, vessie, peau	+	+	+	(Nishimura et al. 2005; Giacomini et al. 2010)
MRP5/SMRP (ABCC5)	6-mercaptopurine, analogues nucléotidiques cycliques, pemetrexed, gemcitabine, 5-fluorouracil, cytosine arabinoside, méthotrexate	Ubiquitaire	+	+	+	(Nishimura et al. 2005; Pratt et al. 2006; Meyer Zu Schwabedissen, Grube, et al. 2005; Pascolo et al. 2003)
MRP6/ARA (ABCC6)	6-mercaptopurine, glutathion, leukotriène C ₄ , S-glutathion, cyclopentapeptide BQ123	Foie, rein	-	+	-	(Nishimura et al. 2005; Bergen et al. 2007; Behravan et al. 2007)
MRP7/SIMRP7 (ABCC10)	Docétaxel, paclitaxel, estradiol-17-β, leukotriène C ₄	Intestin, peau, testicule	-	+	-	(Nishimura et al. 2005; Hopper-Borge et al. 2011; Krüh et al. 2007; Vinot et al. 2013)
MRP8 (ABCC11)	Nucléotide cyclique (cAMP, cGMP), acide folique, oestradiol-17-β, taurocholate, glycocholate, leukotriène C ₄	Foie, poumon, rein, tissus fœtaux	+	+	+	(Nishimura et al. 2005; Krüh et al. 2007; Serrano et al. 2007)
ALD/ALDP (ABCD1)	Acides gras	Cerveau, foie	-	+	-	(Nishimura et al. 2005; Braiterman et al. 1998)
ABC43/PMPT70 (ABCD3)	Acyl-CoAs (longue chaîne)	Cerveau	-	+	-	(Nishimura et al. 2005; Imanaka et al. 1999; Asheuer et al. 2005)
P70R/PMPT69 (ABCD4)	<i>Inconnu</i>	Cerveau	-	+	-	(Nishimura et al. 2005; Asheuer et al. 2005)

ABC27/ABC50 (ABCF1)	<i>Inconnu</i>	<i>Inconnue</i>	-	+	-	(Nishimura et al. 2005)
BCRP/MXR (ABCG2)	Méthotrexate, mitoxantrone, irinotecan, topotecan, imatinib, doxorubicine, épirubicine, étoposide, ofloxacine, lamivudine, pravastatine, prazosine, nitrofurantoiné, cimetidine, topotecan	Rein, cerveau	+	+	+	(Nishimura et al. 2005; Jeiri 2012; Sissung et al. 2010; Yeboah et al. 2006; Serrano et al. 2007; Mathias et al. 2005; Malépaard et al. 2001)
(ABCG8)	Cholestérol et autres stérols	Foie	-	-	-	(Berge et al. 2000; Nishimura et al. 2005)

Abréviations

- + : présence décrite d'ARNm et/ou de protéines correspondant au gène étudié
- : absence d'ARNm et/ou de protéines correspondant au gène étudié

Tableau 3: Expression des principaux transporteurs membranaires de la famille des *ATP-Binding Cassette (ABC)* chez l'humain

3- Autres familles de transporteurs

Aquaporines (AQP)

Durant la grossesse, les besoins totaux en eaux augmentent significativement du fait de l'augmentation exponentielle du poids fœtal. Ses besoins en eau sont assouvis par un passage transplacentaire d'eau augmenté à partir de la circulation maternelle, suggérant l'idée que le flux d'eau augmente en parallèle de l'âge gestationnel (Sha et al. 2011; Beal et al. 2007).

Bien que la régulation du passage transplacentaire d'eau et sa réabsorption soient des phénomènes encore mal compris, ces deux étapes nécessitent un flux d'eau à travers les membranes biologiques, étapes permises par des transporteurs spécifiques. Ainsi, 13 variétés d'aquaporines (AQP) régulent ce flux d'eau chez l'humain à travers un large panel de membranes biologiques (rein, cerveau, placenta, etc.) (Sha et al. 2011). Au niveau du placenta humain, à ce jour, seules AQP1, 3, 8 et 9 semblent exprimées (CT et ST et chorion) (Sha et al. 2011).

Les ATPases de transport du cuivre

Le cuivre est un élément nécessaire à la survie de tous les organismes. En effet, il permet entre autres, la réalisation de nombreuses réactions enzymatiques physiologiques. L'existence de pathologies sévères du métabolisme du cuivre (Maladies de Menkes et de Wilson) témoigne de la nécessité d'une homéostasie stricte du cuivre.

Durant la grossesse, l'homéostasie du cuivre est également cruciale, en effet il a été montré qu'un déficit maternel en cuivre pouvait induire des fausses couches et des malformations diverses (Hardman, Luff, and Ackland 2011). Afin d'assurer au fœtus des apports suffisants en cuivre, il a été montré qu'il existait au niveau du placenta des transporteurs d'efflux spécifiques (ATPase) du cuivre : ATP7A/MNK (Menkes) et ATP7B/WND (Wilson) (Hardman, Luff, and Ackland 2011), mais aussi des transporteurs d'influx non dépendants de l'ATP comme CTR1 (*copper transporter*)

(Hardman et al. 2006).

Des auteurs se sont principalement intéressés à l'expression des deux premières protéines dans le placenta humain à terme, ainsi qu'à leur localisation au niveau de la barrière placentaire (Hardman, Luff, and Ackland 2011). Ainsi, par immunohistochimie et immuno-marquage à l'or, les auteurs ont retrouvé ATP7A/MNK au niveau du versant basal du ST et de certaines cellules endothéliales alors que ATP7B/WND était principalement retrouvé au niveau du versant apical du même ST (Hardman, Luff, and Ackland 2011).

Concernant CTR1, la protéine a été retrouvée sur des placentas à terme en western blot, et a été localisée au niveau de la face basale du ST par immunohistochimie (Hardman et al. 2006).

Major vault protein (MVP) – Lung resistance-related protein (LRP)

MVP/LRP est une ribonucléoprotéine de 104 kDa, ayant la forme d'un « tonneau creux », impliquée dans les mécanismes de résistance aux anticancéreux (Lara et al. 2011; Berger et al. 2009). Cette protéine impliquée dans les mécanismes de transport cellulaire est exprimée au niveau des tissus sains mais aussi des tissus tumoraux (Schroeijers et al. 1998). Son taux d'expression peut servir d'outil pronostique dans les modèles tumoraux (Schroeijers et al. 1998).

Dans le placenta humain, les données sont quasi inexistantes. Une seule équipe a recherché la présence de MVP/LRP dans du tissu placentaire total sans pour autant la retrouver (Sugawara et al. 1997).

VDAC1 (Voltage-dependent anion-selective channel protein 1)

Peu d'informations existent sur ce transporteur au sein du placenta humain et de son rôle en particulier. Il s'agit d'une protéine transmembranaire, présente notamment au niveau des mitochondries, ayant pour rôle le transport de calcium en particulier (Hache et al. 2011). Son rôle a été étudié pendant la grossesse, notamment dans les placentas normaux et lors de pathologies gravidiques comme la prééclampsie. Son ARNm a été retrouvé dans des extraits de tissus placentaire total et son expression ne

semblait pas varier chez les patientes prééclamptiques (Hache et al. 2011).

III – Cancer du sein durant la grossesse et passage transplacentaire des taxanes et autres agents anticancéreux

A- Cancer du sein durant la grossesse.

Sur le plan épidémiologique, d'après l'Institut de veille sanitaire (InVS), avec quasiment 50 000 nouveaux cas en France en 2005, le cancer du sein est le cancer le plus fréquent de la femme. Son incidence augmente avec l'âge jusqu'à 61 ans, puis décroît progressivement. Chez les patientes en âge de procréer, il est intéressant de noter que l'incidence globale du cancer du sein augmente de façon linéaire, de 15 à 45 ans. Dans cette même population de femme en âge de procréer, la part des femmes enceintes est relativement faible, évaluée entre 0.3 et 3.8% en fonction des données disponibles (Andersson et al. 2009; Stensheim et al. 2009).

Les cancers du sein découverts durant la grossesse restent relativement rares, comptant pour environ 0.5 % de la totalité des cancers du sein (Stensheim et al. 2009; Andersson et al. 2009). Ils compliquent entre 1 grossesse pour 3000 à une grossesse pour 10 000, ce qui fait de ce cancer un des plus fréquemment rencontrés durant la grossesse (Stensheim et al. 2009), si ce n'est le premier pour certains auteurs (Van Calsteren, Heyns, et al. 2010).

D'une manière générale, nous assistons à une augmentation de l'incidence des cancers du sein avec une progression annuelle de +2.4% entre 1980 et 2005 (InVS). Le même phénomène a été noté chez les patientes enceintes avec une possible tendance à la stabilisation ces dernières années (Andersson et al. 2009), ce phénomène d'augmentation d'incidence pouvant être expliqué par l'âge de plus en plus tardif des premières grossesses dans les pays développés (Mir et al. 2008).

Ainsi, l'augmentation des cas de cancers du sein pendant la grossesse serait due à la conjonction de deux phénomènes : une augmentation de l'incidence des cancers du

sein dans la population générale et un âge plus élevé des femmes enceintes.

Sur le plan du diagnostic du cancer du sein et de son annonce, établir ce diagnostic chez une femme enceinte est un événement dramatique, qui pose un problème humain, psychologique, éthique et médical.

Premièrement, il existe chez ces patientes un dilemme psychologique et émotionnel qui se situe entre le bonheur d'attendre un enfant et l'annonce d'une maladie grave et potentiellement mortelle, ce qui menace l'avenir de la future cellule familiale.

Deuxièmement, il existe un dilemme médical, confrontant deux possibilités : i) opter pour des procédures diagnostiques et thérapeutiques habituellement proposées aux patientes non enceintes, afin de prendre en charge de manière optimale la future mère, avec un risque non négligeable de générer des complications fœtales graves ; ii) adopter un traitement moins dangereux voire retardé, afin de préserver la santé du fœtus, avec le risque concomitant d'une perte de chance pour la mère.

Troisièmement, il existe un problème éthique devant la possibilité d'une interruption de la grossesse afin de donner à la mère le plus de chances de guérir en la traitant de la manière la plus adéquate.

Enfin, un dernier problème : celui d'une éventuelle prochaine grossesse après avoir été traitée pour un cancer, et des risques encourus pour celle-ci.

Sur le plan thérapeutique, s'il y a une indication à traiter la patiente, il faut l'informer que la chimiothérapie, malgré des effets secondaires reconnus, reste un traitement crucial du cancer du sein (Berveiller and Mir 2012) et qu'elle peut être utilisée durant la grossesse (Ring et al. 2005; Mathieu et al. 2002; Germann, Goffinet, and Goldwasser 2004; Mir et al. 2008), tout en évitant la période critique d'organogénèse correspondant au premier trimestre (Amant et al. 2010), et en assurant une surveillance fœtale stricte durant les 2^{ème} et 3^{ème} trimestres (Amant et al. 2010).

Les molécules de chimiothérapie les plus utilisées dans le cancer du sein (y compris pendant la grossesse) sont les anthracyclines, le cyclophosphamide et les taxanes (Loibl et al. 2012). Ces derniers (paclitaxel et docétaxel) qui sont des stabilisateurs du fuseau mitotique induisant *in fine* une apoptose (Vaclavikova et al. 2004), ont une efficacité largement démontrée dans le cancer du sein (Holmes et al. 1991; Chevallier et al. 1995), mais également dans les cancers de l'ovaire et du poumon. Cependant, même si le paclitaxel et le docétaxel font partie de la même famille

médicamenteuse, ces deux molécules très utilisées en pratique quotidienne ont des propriétés pharmacologiques différentes (structure chimique, poids moléculaire, élimination, fixation protéique). Faute de données concernant leur passage transplacentaire, le choix de l'une ou l'autre drogue chez la femme enceinte demeure de nos jours encore largement empirique.

B- Les taxanes: historique, structure chimique, propriétés pharmacologiques et mode d'action.

L'historique des taxanes a débuté en 1962 lors d'une campagne menée aux Etats-Unis par le *National Cancer Institute* et le *US Department of Agriculture* ayant pour but la découverte de nouveaux extraits naturels de plantes potentiellement actifs contre le cancer (Kingston 2007). C'est ainsi que l'if de l'ouest (*Taxus brevifolia*) a été testé et que des extraits présents dans son écorce se sont révélés cytotoxiques contre des cellules de carcinomes épidermoïde KB. Quatre ans plus tard, d'autres essais ont montré que les extraits d'écorce d'if étaient également actifs contre des cellules leucémiques et en 1969, une nouvelle molécule voit le jour : le paclitaxel (Kingston 2007). Sa structure a été définie deux ans plus tard grâce à des études de résonance magnétique nucléaire et à l'analyse par diffraction des rayons X des deux produits obtenus après traitement basique de la molécule : la 10-désacétylbaccatine III (10-DAB) et l'ester méthylique de la N-benzoylphenylisoserine (Wani et al. 1971) (Figs. 11 et 12).

Mêmes si les premières études cliniques du taxol n'ont pas été très encourageantes, les recherches ont néanmoins été poursuivies au *National Cancer Institute*, avec la découverte d'une activité du paclitaxel dans un modèle de mélanome B16. Puis, Horwitz et coll. ont découvert que le paclitaxel agissait sur les microtubules en 1979, ce qui a permis de rendre cette molécule célèbre dans le monde de la recherche biomédicale (Horwitz 2004). Suite à cette découverte et après plusieurs années d'études précliniques et toxicologiques, le premier essai clinique a débuté en 1984, suivi en 1992 par l'accord de mise sur le marché du paclitaxel dans les cancers de l'ovaire par la *Food and Drug Administration* (McGuire et al. 1989). Il faudra attendre deux années supplémentaires pour que le paclitaxel soit autorisé dans la prise

en charge du cancer du sein (Holmes et al. 1991).

Dans les années qui suivirent, l'utilisation du paclitaxel s'est progressivement généralisée dans les cancers du poumon ou les sarcomes de Kaposi.

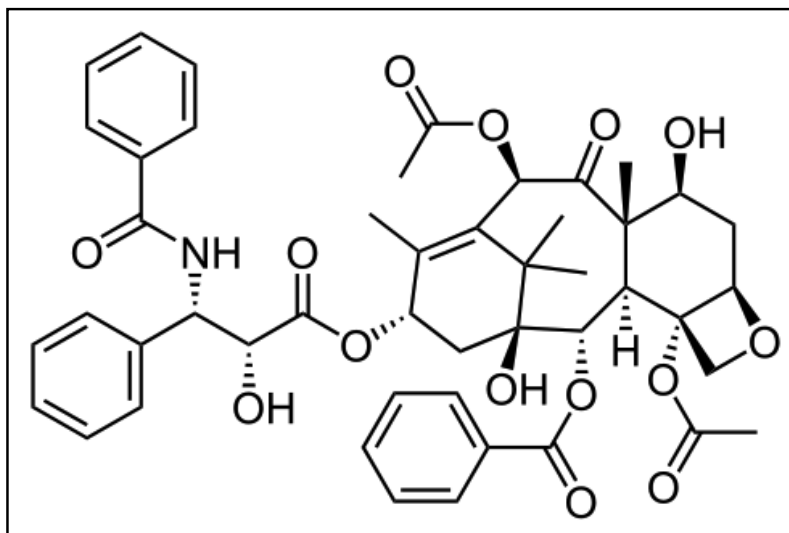


Figure 11: Structure chimique du paclitaxel

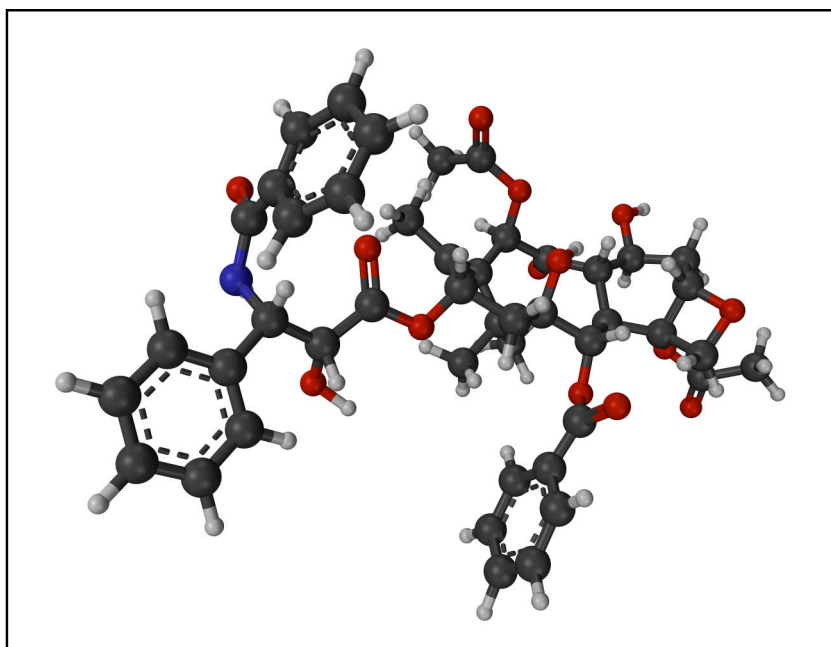


Figure 12: Représentation en 3 dimensions de la molécule de paclitaxel (extrait de commons.wikimedia.org – 2013)

La paclitaxel présentait cependant un écueil de poids, à savoir sa disponibilité. En effet, il fallait abattre environ un millier d'arbres pour produire un kilogramme de paclitaxel et chaque arbre mettait environ deux siècles pour obtenir une taille « adulte » ; ceci ayant entraîné des polémiques tenaces entre écologistes et laboratoires de recherche. Afin de contrer cet inconvénient majeur, une équipe avait réussi à étudier les aiguilles de l'if commun alias *Taxus baccata* (et non plus son écorce) et avait démontré leur grande richesse en 10-DAB. Pour obtenir du paclitaxel, il suffisait d'y adjoindre une chaîne latérale et une acétylation en C₁₀, ce que fit cette équipe en 1988 (hémi-synthèse du paclitaxel) (Gueritte-Voegelein et al. 1991). Lors de cette hémi-synthèse, la même équipe découvrit un intermédiaire potentiellement plus efficace : le docétaxel (Gueritte-Voegelein et al. 1991).

L'une des principales différences entre ces deux taxanes se situait au niveau du carbone₁₀ : l'acétate (CH₃COO⁻) du paclitaxel était remplacé par un hydroxyle (-OH), ce qui rendait le docétaxel plus soluble dans l'eau. Le benzoate (C₆H₅COOH) de la chaîne latérale était en outre remplacé par un groupement *tert*-butylcarbonate [(CH₃)₃CO₃²⁻] (Figs. 13 et 14). Les premiers essais cliniques de phase I ont alors débuté en 1990 pour finalement aboutir à une autorisation de l'utilisation du docétaxel aux Etats-Unis en 1996.

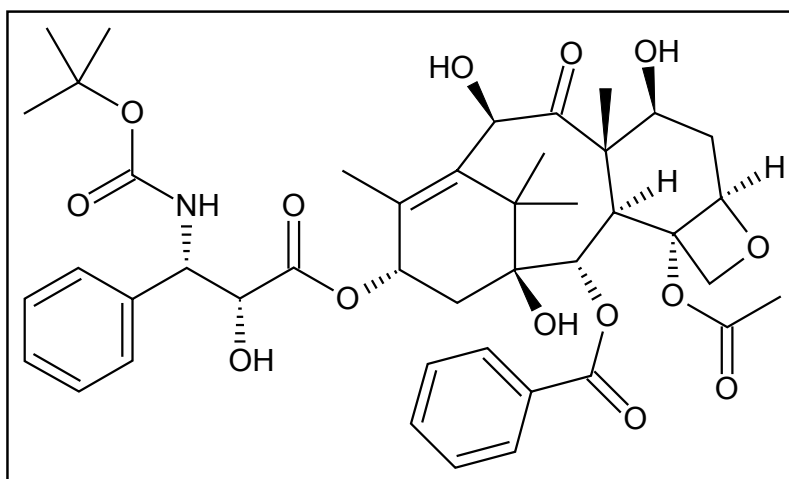


Figure 13: structure chimique du docétaxel.

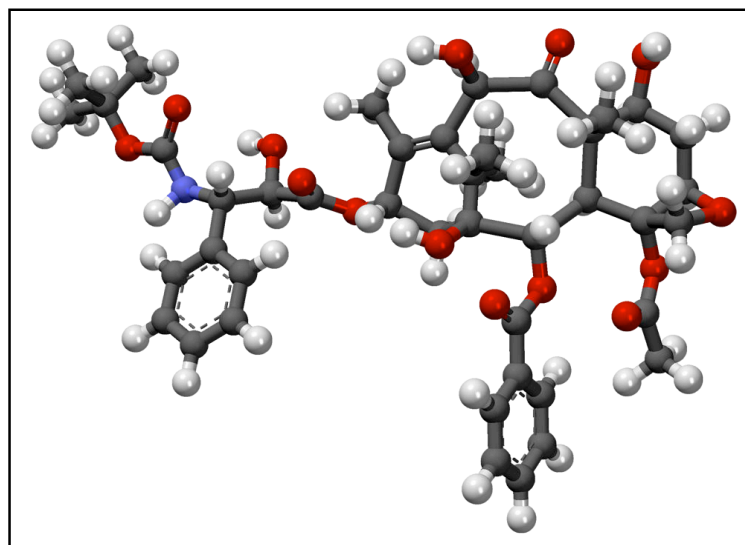


Figure 14: représentation en 3 dimensions de la molécule de docétaxel (extrait de commons.wikimedia.org – 2013).

Les taxanes représentent une grande famille puisque celle-ci compte plus de 300 composés (Baloglu and Kingston 1999). Les taxanes présentent pour la grande majorité un squelette diterpénique comportant 3 cycles avec 20 atomes de carbone (Fig. 15).

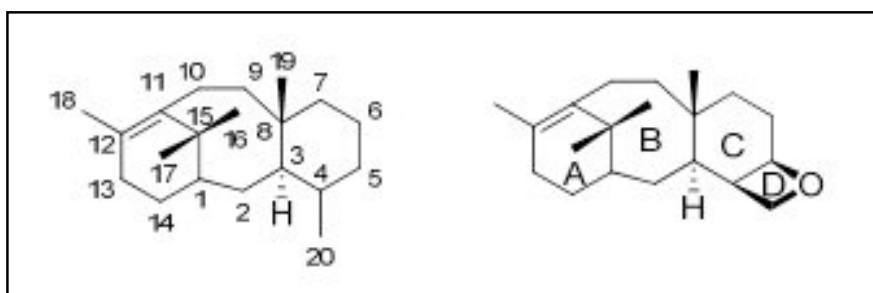


Figure 15: squelette des taxanes (d'après R. Aouzal. 2010).

Les taxanes possèdent un cycle A de conformation bateau déformé, possédant une double liaison en tête de pont, un cycle B à huit chaînons de conformation chaise-

bateau portant deux groupements méthyle en position pseudo-axiale, et un cycle C de conformation demi-chaise possédant une jonction trans- avec le cycle B. Ces composés comportent quatre centres quaternaires, douze centres asymétriques, et dix fonctions oxygénées (Fig. 15).

Malgré leur grand nombre, les taxanes ont pu être classés en quatre grands groupes, notamment selon la nature des fonctions oxygénée en C₄-C₂₀:

- Groupe A : ce premier groupe comprend les taxanes possédant une double liaison exocyclique en C₄. On peut citer dans ce groupe la taxine B, un des alcaloïdes responsables de la toxicité de l'if commun (Fig. 16).

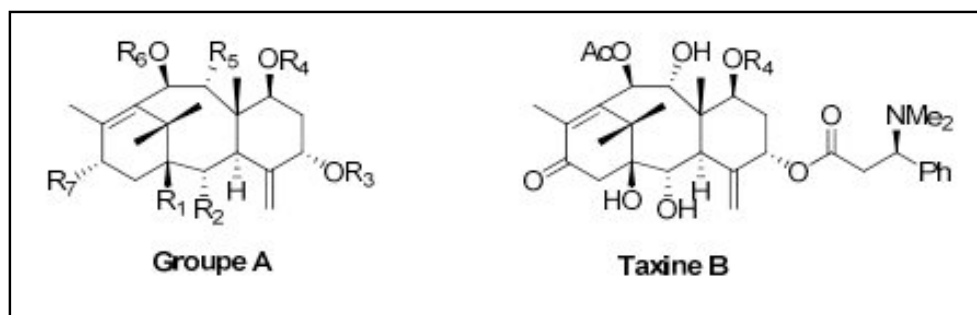


Figure 16: représentation du groupe 1 des taxanes et de la taxine B (d'après R. Aouzal. 2010).

- Groupe B : ce groupe comprend les taxanes présentant un groupe époxyde (atome d'oxygène ponté sur une liaison carbone-carbone) en position C₄-C₂₀. La baccatine I fait par exemple partie de ce groupe (Fig. 17).

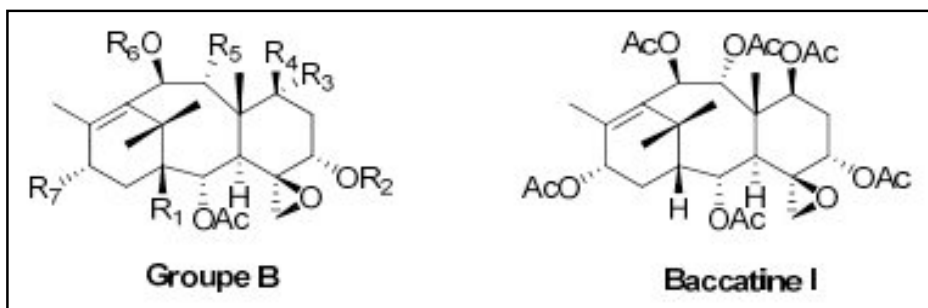


Figure 17: représentation du groupe B des taxanes et de la baccatine I (d'après R. Aouzal. 2010).

- Groupe C : ce groupe comprend des taxanes qui possèdent un groupe oxétane (C_3H_6O), comme le paclitaxel ou la 10-DAB (Fig. 18). Ce cycle oxétane est une caractéristique cruciale étant donné que ce cycle est impliqué dans la fixation des taxanes du groupe C aux microtubules.

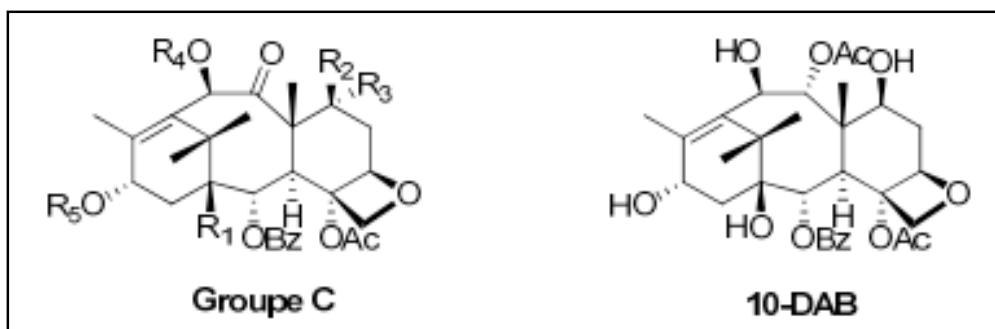


Figure 18: représentation du groupe C des taxanes et du 10-DAB (d'après R. Aouzal. 2010).

- Groupe D : ce dernier groupe est celui qui compte le moins de représentants. Ces taxanes ne présentent pas le système tricyclique habituel, mais deux cycles à six chaînons et un à dix, ce qui en fait sa particularité. Par exemple, la taxine A représentée ci-dessous (Fig. 19), constitue un poison violent issu de l'if commun.

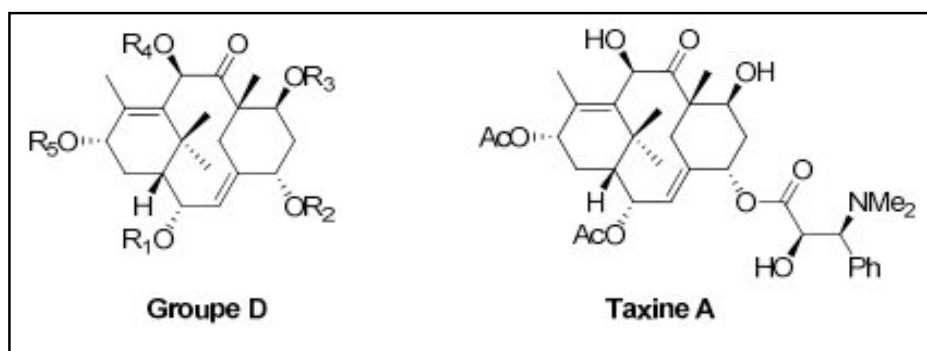


Figure 19: représentation du groupe D des taxanes et de la taxine A (d'après R. Aouzal. 2010).

Le paclitaxel a comme formule brute la suivante, $C_{47}H_{51}NO_{14}$ pour un poids moléculaire de 853,91 g/mol (kDa) tandis que le docétaxel a la suivante : $C_{43}H_{53}NO_{14}$

pour une masse moléculaire de 807,88 g/mol (kDa). Le taux de fixation aux protéines plasmatiques est de 89-98% et de plus de 98% pour le paclitaxel et le docétaxel, respectivement. Les deux molécules de taxanes sont très lipophiles avec une quasi-insolubilité dans l'eau. Concernant leur métabolisme, le paclitaxel et le docétaxel sont métabolisés essentiellement par le foie (CYP2C8 et 3A4). Leur demi-vie d'élimination est de 5.8h et de 86h pour le paclitaxel et le docétaxel, respectivement. Enfin, concernant leur élimination, le paclitaxel est éliminé dans les fèces et les urines alors que le docétaxel présente une élimination biliaire.

Concernant le mode d'action des taxanes, ils font partie de la famille des poisons du fuseau mitotique, au même titre que la colchicine (médicament utilisé dans la goutte), la vincristine, ou la vinblastine (tous deux utilisés en tant qu'agents anticancéreux). Cependant leur mode d'action, mis en évidence pour la première fois en utilisant le paclitaxel, semble tout à fait original (Horwitz 2004). En effet, les poisons du fuseau mitotique agissent sur le cycle cellulaire, en bloquant la division cellulaire au moment de la mitose, provoquant ainsi la mort cellulaire (Vaclavikova et al. 2004). Ainsi, les cellules à fort taux de division, dont font partie les cellules cancéreuses, sont les plus touchées par de telles molécules.

Plus précisément, les taxanes agissent sur les microtubules, les « rails » qui guident le matériel génétique de la cellule mère vers les deux cellules filles lors de la mitose. Les microtubules sont des fibres constitutives du cytosquelette. Ce sont des tubes creux de 25 nm de diamètre dont les parois sont elles-mêmes constituées de plusieurs protofilaments de tubuline (13 par microtubule). Ces protofilaments sont issus de la polymérisation de la tubuline, une protéine constituée de deux sous-unités, α et β (Fig. 20) (Gaskin, Cantor, and Shelanski 1974). En présence de paclitaxel, il y a un phénomène de stabilisation du cytosquelette des microtubules, inhibant ainsi leur dépolymérisation (Correia and Lobert 2001). Le paclitaxel se fixe dans une poche de β -tubuline, site accessible mais exposé partiellement quand la tubuline est déjà incorporée dans le microtubule (Amos 2004). Ce site de fixation est en fait situé à l'interface entre deux protofilaments adjacents (Correia and Lobert 2001). Le paclitaxel se fixe préférentiellement sur les microtubules que sur le dimère de tubuline avec une stœchiométrie d'une mole de paclitaxel par mole de dimère de tubuline

polymérisée (Parness and Horwitz 1981). Enfin, cette fixation à la tubuline polymérisée est réversible.

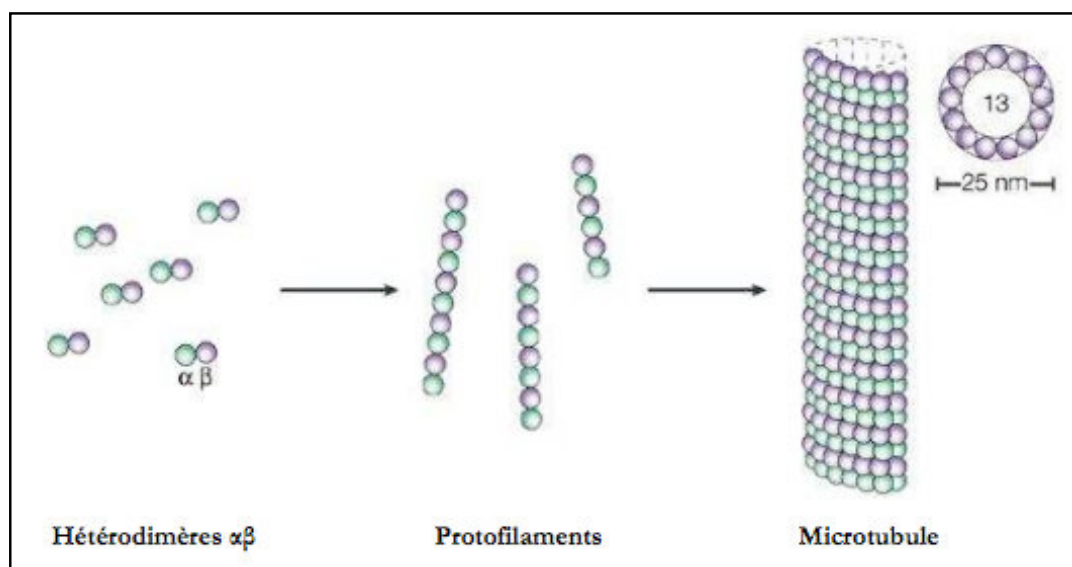


Figure 20: représentation de la structure des microtubules (d'après R. Aouzal. 2010).

En se fixant dans cette poche, le paclitaxel va interférer avec la dynamique des microtubules en promouvant leur formation et en les stabilisant afin d'inhiber leur dépolymérisation. La stabilisation est accompagnée par des modifications structurales dans les microtubules, qui se traduisent notamment par une altération de la conformation des sous-unités de la tubuline, ce qui retarde ainsi la dissociation de l'hétérodimère de tubuline (Grosios et al. 1999). Cette stabilité des microtubules induite par le paclitaxel est fatale pour la cellule, du fait des perturbations induites sur les structures cytoplasmiques dépendantes des microtubules, avec par exemple des répercussions sur la mitose, le maintien de la morphologie cellulaire ou la sécrétion (Chen, Meng, and Ding 2010). Dans le cas de la mitose, le paclitaxel bloque le cycle cellulaire en phase G2 ou M en empêchant le transport des chromosomes dans la cellule en division (Amos 2004; Correia and Lobert 2001).

C- Passage transplacentaire des taxanes

Compte tenu de l'incidence toujours croissante des cas de cancers du sein pendant la grossesse, certaines équipes se sont intéressées au profil de toxicité des drogues utilisées couramment dans ce type de cancer, et plus particulièrement les taxanes. Malheureusement, ces données sont pour l'heure très fragmentaires, notamment sur le plan de la recherche clinique (limitées à ces *case reports* ou à des séries de cas au mieux).

Cependant, nous avons réalisé récemment une revue de la littérature qui semblait montrer, chez des patientes traitées par docétaxel ou paclitaxel durant leur grossesse, un profil de toxicité maternelle et fœtale favorable, aussi bien pour l'une ou l'autre de ces deux drogues (Mir et al. 2010).

Nous avons retrouvé 40 cas de patientes exposées aux taxanes, dont 21 au paclitaxel, 16 au docétaxel et 3 aux deux molécules. Les indications étaient des cancers du sein dans 27 cas, des cancers de l'ovaire dans 10 cas et des cancers du poumon (non à petites cellules) dans 3 cas. Concernant la toxicité maternelle, elle fut conforme à celle retrouvée chez les patientes non enceintes. Concernant la toxicité fœtale, un fœtus avec de nombreuses malformations décéda à J5 de vie, tout en notant que ces malformations avaient été découvertes avant l'initiation du docétaxel. Deux autres enfants exposés au paclitaxel étaient nés à 30 et 32 SA et avaient présenté une détresse respiratoire nécessitant un transfert en réanimation néonatale. Il est à noter que cette détresse respiratoire était potentiellement en rapport avec la prématurité associée. La seule malformation potentiellement imputable aux taxanes était une sténose du pylore retrouvée chez un fœtus dont la mère avait reçu plusieurs molécules de chimiothérapies dont les deux molécules de taxanes.

Ainsi, dans cette revue de la littérature, nous avons retrouvé un profil de toxicité favorable des taxanes utilisés lors des 2^{ème} et 3^{ème} trimestres de la grossesse. Cependant, le caractère rétrospectif de cette étude et le faible nombre de cas rapportés ne permettait pas d'établir avec certitude un éventuel risque fœtal secondaire et à distance de l'utilisation des taxanes pendant la grossesse. Il nous semblait donc nécessaire de poursuivre les études pharmacocinétiques chez la femme enceinte et le suivi à long terme des nouveau-nés issus de patientes traitées par taxanes durant la grossesse (Mir et al. 2010).

Par ailleurs, certaines équipes ont documenté plus spécifiquement des données de

pharmacocinétique chez la femme enceinte. Ainsi, les conclusions allaient dans le sens d'un sous-dosage des taxanes (aux doses utilisées chez les patientes non enceintes) compte tenu des modifications ayant lieu pendant la grossesse (Van Calsteren, Verbesselt, et al. 2010; Lycette et al. 2006) telles que l'augmentation du volume plasmatique et de la clearance rénale par exemple. En revanche, les données de passage transplacentaire n'étaient pas renseignées.

Compte tenu de ces données cliniques encore trop rares, certaines équipes ont tenté d'évaluer le passage transplacentaire des chimiothérapies en utilisant les modèles expérimentaux (précliniques) exposés au préalable.

Concernant les taxanes, les données de passage transplacentaire étaient infimes. Une seule équipe a documenté le passage du paclitaxel en utilisant le modèle du cotylédon humain perfusé en retrouvant un passage faible du paclitaxel de $3.97 \pm 1.76\%$ (Nanovskaya et al. 2008). Ils ont par ailleurs réalisé une étude de fonctionnalité permettant de mettre en évidence le rôle joué par la P-gp en inhibant celle-ci, faisant ainsi monter le passage du paclitaxel à $6.56 \pm 2.30\%$. Il n'y a à ce jour aucune donnée concernant le docétaxel qui est également couramment utilisé chez les femmes enceintes atteintes de cancer du sein.

D- Passage transplacentaire des autres agents anticancéreux

Il y a quelques données éparses de passage transplacentaire (modèle du cotylédon perfusé) concernant d'autres molécules de chimiothérapie utilisées pendant la grossesse, comme pour la doxorubicine (Karp et al. 1983; Roboz et al. 1979; Grohard et al. 1989), l'épirubicine (Gaillard et al. 1995) ou les sels de platines (Al-Saleh et al. 2008; Al-Saleh et al. 2007).

D'autres équipes se sont intéressées au modèle animal en perfusant des babouins avec différentes chimiothérapies et ont réalisé des études pharmacocinétiques (Van Calsteren, Verbesselt, et al. 2010). Leurs résultats corroboraient le fait que les doses utilisées de chimiothérapie étaient probablement trop faibles du fait des changements

physiologiques secondaires à la grossesse. Ainsi, pour le paclitaxel et deux anthracyclines, les concentrations plasmatiques étaient trop faibles comparées à celles obtenues chez des sujets sains (Van Calsteren, Verbesselt, et al. 2010).

Le modèle animal (babouin) a été utilisé également en suivant le même principe de perfusion de chimiothérapie (paclitaxel et docétaxel, carboplatine). Outre les ratios « concentrations néonatales/concentrations maternelles », les auteurs avaient évalué la quantité de chimiothérapie présente dans les tissus fœtaux après sacrifice (Calsteren et al. 2010). De manière intéressante, le passage des deux taxanes était faible mais présentait cependant des différences, et leur fixation aux différents organes était non comparable.

Enfin, d'autres équipes utilisent des « modèles » cliniques pour déterminer le passage transplacentaire des chimiothérapies. Par exemple, Marnitz et coll. ont rapporté le cas d'une patiente traitée par sels de platine pendant la grossesse (Marnitz et al. 2009). Ils avaient réalisé des dosages de cisplatine au niveau du sang maternel, du sang de cordon à la naissance, mais également dans le liquide amniotique lors d'une amniocentèse. De façon notable, les concentrations de cisplatine dans le liquide amniotique atteignaient 10% de la concentration dans le sang maternel, et lors de l'accouchement, les concentrations néonatales étaient trois fois plus élevées que dans le liquide amniotique (Marnitz et al. 2009). Ce *case report* témoigne de l'utilité d'utiliser des modèles cliniques afin de corroborer les données issues des expérimentations *in vitro*, *ex vivo* ou *in vivo* chez l'animal.

Objectifs de l'étude

Compte tenu des informations données plus haut, l'objectif de ce travail était de répondre à plusieurs questions concernant d'une part les transporteurs de médicaments, et d'autre part l'utilisation des taxanes chez la femme enceinte:

- 1- Dresser une cartographie spatio-temporelle des transporteurs placentaires au cours de la grossesse (premier trimestre et placentas à terme) en utilisant un modèle de culture primaire de trophoblastes humains.
- 2- Déterminer le passage transplacentaire et l'accumulation placentaire de deux molécules de chimiothérapie (paclitaxel et docétaxel) utilisées couramment et indifféremment chez la femme enceinte, en utilisant le modèle du cotylédon placentaire perfusé, puis d'objectiver et comparer leur taux d'accumulation placentaire.
- 3- Déterminer les répercussions potentielles d'une molécule de chimiothérapie (paclitaxel) sur le placenta en étudiant particulièrement les effets sur l'expression de nombreux transporteurs placentaires, et ce à l'aide d'un modèle de culture primaire de trophoblastes d'une part, mais également à l'aide de cotylédons humains perfusés par du paclitaxel et enfin, avec des cotylédons de femmes enceintes traitées par du paclitaxel durant leur grossesse d'autre part.

Matériel et méthodes

Afin d'étudier les tenants et aboutissants du passage transplacentaire des médicaments, il convient de détailler successivement les différents « outils » qui ont été utilisés afin de répondre à nos questions.

1- Le modèle du cotylédon placentaire humain perfusé

Matériels et réactifs

- a) Chaîne de perfusion comprenant : réservoirs contenant les perfusats (Fig. 21A), bain-marie (Fig. 21B), chambre de perfusion (Fig. 21C), deux pompes péristaltiques maternelle et fœtale (Fig. 21D), agitateurs, débitmètres (Fig. 21E), cathéters maternels, bac à manipulation, bistouri, ciseaux, fil Vicryl rapide 2/0, porte-aiguille.
- b) Earle (6,80g NaCl, 0,40g KCl, 0,125g NaH₂PO₄ & H₂O, 0,20g MgSO₄ & 7H₂O, 1,00g Glucose, 0,20g CaCl₂ anhydre, 2,20g NaHCO₃, 1000 ml eau distillée qsp) 1500 mL pour le côté fœtal, et 1500 mL pour le côté maternel.
- c) Antipyrine C₁₁H₁₂N₂O 1,5 mL d'une solution à 20mg/mL (substance de référence, car elle traverse la barrière placentaire à 100% par une diffusion passive) (Schneider, Panigel, and Dancis 1972; Al-Saleh et al. 2008).
- d) Albumine 30% (albumine de sérum bovin, Euromedex, Souffel Weyersheim, France), 2 g/l ou 30 g/l en fonction des conditions.
- e) Paclitaxel (Taxol[®] - 6mg/mL - Bristol Myers Squibb) : 0,2 mL qsp 3 mL de sérum glucosé à 5% afin d'obtenir une concentration maximale (C_{max}) avoisinant la C_{max} retrouvée chez l'humain (1530 ng/mL) (Berveiller et al. 2012). Les excipients sont les suivants : éthanol à 96 %, acide citrique anhydre, ricinoléate de macrogolglycérol. Les excipients sont les suivants : polysorbate 80, éthanol anhydre, acide citrique.

- f) Docétaxel (Taxotère® - 20mg/2mL – Sanofi-Aventis) : 0,5 mL qsp 10 mL de sérum glucosé 5% afin d'obtenir une concentration maximale (C_{max}) supérieure ou égale à la C_{max} retrouvée chez l'humain (4150 ng/mL) (Baker et al. 2004).
- g) NaOH 0,1N et 5N (mise à pH des solutions de Earle)
- h) Tubes Eppendorf 2 mL et Tubes Falcon 50ml (Fig. 21F)
- i) Pipettes 10 à 1000 μ l
- j) Placentas issus d'accouchements par les voies naturelles ou par césarienne dont la délivrance a été réalisée de façon précautionneuse de façon à éviter tout dommage.

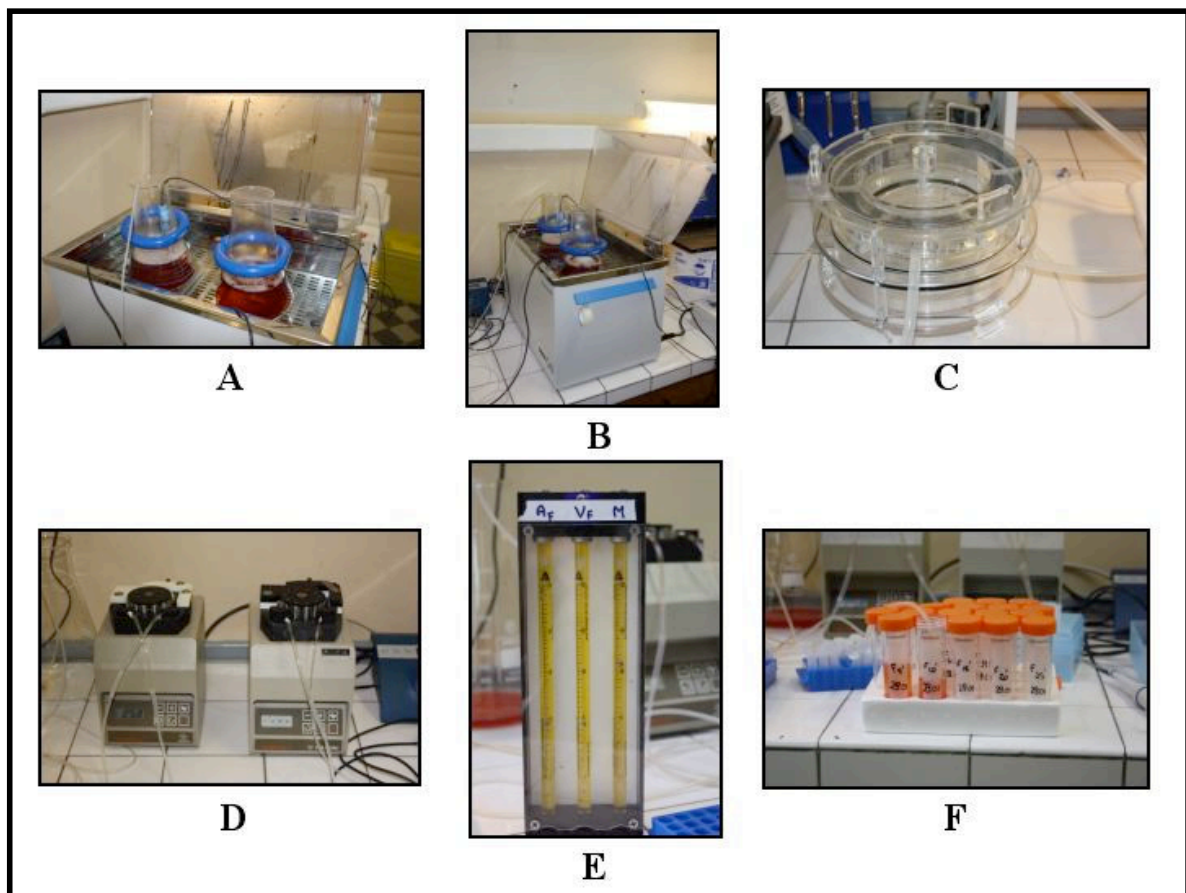


Figure 21: Photographies des différents éléments de la chaîne de perfusion placentaire.

A: réservoirs contenant les perfusats; B: bain-marie; C: chambre de perfusion; D: pompes péristaltiques maternelle et fœtale; E: débitmètre; F: portoir avec tubes Falcon et Eppendorf.

Méthode

- Récupération des placentas : des placentas étaient collectés « à terme » (entre 37 à 41 semaines d'aménorrhée) après consentement signé de la patiente, après une délivrance par voie vaginale ou par césarienne, dans les services de gynécologie et d'obstétrique des maternités Port-Royal et Saint Vincent de Paul (Assistance Publique – Hôpitaux de Paris). Les placentas étaient perfusés dans l'heure suivant la délivrance, selon la méthode adaptée de Schneider (Schneider, Panigel, and Dancis 1972), qui consiste à rétablir la double circulation materno-fœtale, *ex vivo*, sous contrôle du pH, de la température et des débits de perfusion (Fig. 22). Un circuit « ouvert-ouvert » avait été utilisé, c'est-à-dire sans recirculation des perfusats maternel et fœtal.

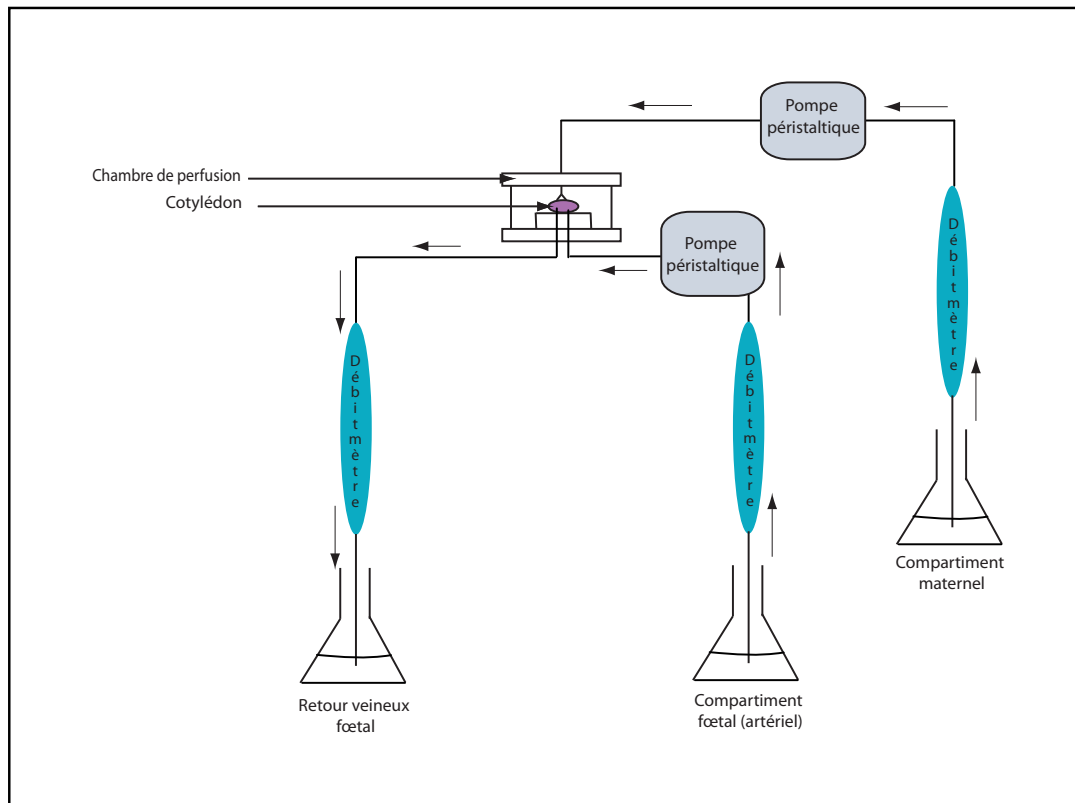


Figure 22: Schéma de montage expérimental du modèle ex vivo de perfusion de cotylédon placentaire d'après Schneider(Schneider, Panigel, and Dancis 1972).

- Critères de non inclusion : les patientes ne devaient pas avoir reçu de traitement au cours du dernier mois de grossesse, ni être porteuses de maladie vasculaire de type diabète, pré-éclampsie, retard de croissance *in utero* (RCIU) pouvant altérer la circulation placentaire. De plus, elles ne devaient pas être porteuses de maladie infectieuse transmissible.

- Préparation du matériel : Dans les deux réservoirs maternel et fœtal contenant chacun 1500 mL d'une solution de Earle, l'albumine y était ajoutée. Ces solutions étaient ensuite « mises à pH » à l'aide de NaOH (5N) (pH= 7.4 ± 0.1 du côté maternel et 7.2 ± 0.1 du côté fœtal). Ces deux réservoirs étaient maintenus à 37°C dans le bain-marie. L'antipyrine n'était ajoutée que dans la solution maternelle. Les drogues d'intérêt (paclitaxel et docétaxel) étaient préparées auparavant par le service de Pharmacie de l'hôpital Cochin. Pour mémoire, le paclitaxel a une conservation de 7 jours à température ambiante tandis que le docétaxel se conserve 48h à 4°C.

- Perfusion : Après s'être assuré de l'absence de critère d'exclusion, et après avoir vérifié l'intégrité macroscopique d'un cotylédon d'intérêt, une artère et une

veine fœtales conjointes, sans ramification distale étaient cathétérisées et perfusées avec la solution de Earle (réservoir fœtal) à un débit de 6 mL/min. Après s'être assuré de l'existence d'un retour veineux satisfaisant à l'aide du débitmètre fœtal (photographie E), et dès que le cotylédon apparaissait gonflé et blanchi, ce dernier était isolé du reste du placenta par une dissection à l'aide du bistouri. Il était ensuite placé (après l'avoir retourné) dans la chambre de perfusion thermostatée (37°C) à l'aide d'une circulation d'eau chauffée au bain-marie (Fig. 23).

Afin de mettre en place la circulation maternelle, deux cathlons étaient ensuite introduits au niveau de la face maternelle du cotylédon blanchi (Fig. 23), puis la perfusion débutait avec la solution de Earle contenant l'albumine, l'antipyrine et le médicament testé (réservoir maternel), à un débit contrôlé de 12 mL/min.

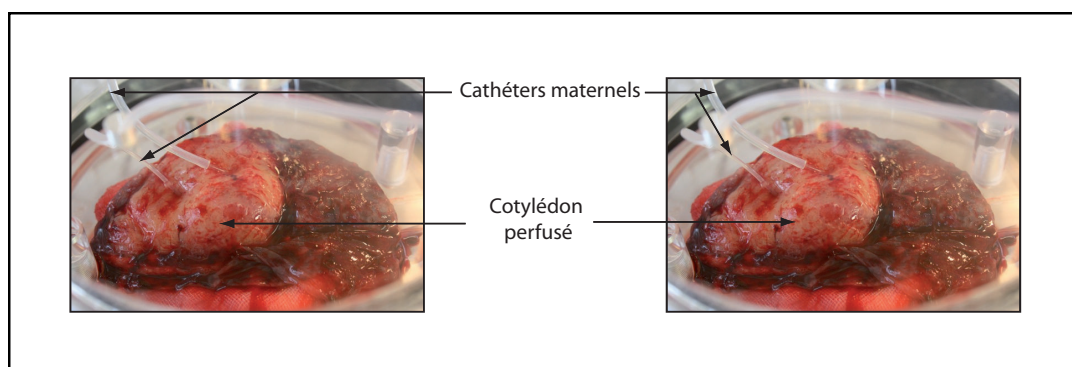


Figure 23: Photographies réalisées lors d'une procédure de perfusion placentaire.

Une fois la perfusion mise en place et les débits contrôlés, des échantillons étaient prélevés toutes les 30 minutes dans la solution maternelle, et toutes les 5 minutes dans la solution fœtale afin de doser l'antipyrine et les concentrations de la drogue administrée (Fig. 21-F). La durée totale d'une perfusion de cotylédon était de 90 minutes de façon à étudier la cinétique de passage transplacentaire une fois le plateau atteint.

A l'issue des 90 minutes de perfusion, le cotylédon était conservé à -20°C en vue de potentielles explorations futures (évaluation de l'expression de transporteurs de médicaments, accumulation intra-cotylédonnaire du médicament par exemple).

L'antipyrine était dosée par *High Performance Liquid Chromatography* avec détecteur ultraviolet (HPLC-UV) dans le laboratoire de pharmacie clinique de la Faculté de pharmacie de Châtenay-Malabry. Les résultats étaient donnés sous forme de concentrations maternelles et fœtales en fonction du temps. Un rapport de la concentration fœtale sur la concentration maternelle (taux de transfert fœtal ou TTF) de l'antipyrine était alors calculé, et si le résultat était supérieur à 20%, l'expérience était validée (intégrité cotylédonaire et *overlap* materno-fœtal). Les échantillons pouvaient alors être envoyés à l'Institut Gustave Roussy (Villejuif) afin de procéder aux dosages des concentrations maternelles et fœtales de taxanes aux différents temps de la perfusion. Ces dosages ont été réalisés par chromatographie liquide et spectrométrie de masse (LC-MS).

- Design : Les placentas ont été perfusés dans des conditions « physiologiques » d'albumine (30 g/L) à raison de 3 placentas pour le paclitaxel et 3 pour le docetaxel. Puis, afin de mettre en évidence une potentielle relation albumine/passage transplacentaire, les placentas ont ensuite été perfusés dans des concentrations d'albumine faibles (2g/L) avec n=3 pour le paclitaxel et n=3 pour le docetaxel.

- Méthodes de calcul et analyse statistique: Afin de pouvoir interpréter les données issues de ces manipulations, il est nécessaire d'introduire plusieurs formules de calcul concernant les paramètres de transport :

- Le premier paramètre de transport à calculer était le taux de transfert fœtal (TTF) : ce paramètre correspond au rapport de la concentration fœtale d'une molécule donnée sur la concentration maternelle de cette même molécule, multiplié par 100. Le TTF s'exprime en pourcentage et correspond à la fraction de la molécule retrouvée dans la circulation fœtale.

Le TTF était donc calculé pour les molécules étudiées (taxanes) mais aussi pour la substance de référence qu'est l'antipyrine, cette dernière ne traversant pas de manière identique chaque placenta.

- Le deuxième paramètre à étudier était l'indice de clearance (IC). Ce paramètre correspond au rapport du TTF de la molécule étudiée sur le TTF de la substance de référence (antipyrine). L'IC n'a donc pas d'unité, et il est compris entre 0 et 1. Plus l'IC se rapproche de 1, plus la molécule étudiée traverse le placenta, et inversement. L'intérêt du calcul de l'IC était de pouvoir comparer les placentas entre eux, car l'IC atténue la variabilité « inter-cotylédon » (en rapport avec le TTF de l'antipyrine respectif de chaque placenta).

2- La culture primaire de trophoblastes

Les placentas utilisés provenaient exclusivement d'accouchements ayant eu lieu par césarienne afin d'éviter tout risque de contamination bactérienne ultérieure. Tous ces placentas étaient issus de grossesses menées à terme, soit entre 39 et 41 semaines + 4 jours d'aménorrhée. Les placentas avaient été obtenus après consentement signé des patientes, dans les services de gynécologie-obstétrique des maternités Port-Royal et Saint Vincent de Paul (Assistance Publique – Hôpitaux de Paris). En attendant toute expérimentation, la conservation des placentas avait lieu dans du sérum physiologique, avec un stockage à +4°C.

Après avoir réalisé l'exérèse des membranes maternelles et fœtales du placenta, plusieurs fragments placentaires étaient prélevés au hasard sur la face maternelle après résection de la plaque basale. Ces fragments étaient par la suite « lavés » dans des bains successifs d'HBSS 1X (Gibco®) à température ambiante, afin d'éliminer tout excédent de sang. Après lavage, les fragments étaient disséqués dans de l'HBSS, à l'aide de pinces fines, afin d'isoler des villosités totales du reste des tissus placentaires. Ces villosités étaient ensuite collectées, et centrifugées à 1200 rotations par minute (rpm) pendant 10 minutes. Le surnageant était éliminé et les culots étaient transférés dans une flasque non ventilée afin d'être pesés.

Une solution préparée à l'avance et mise à température (37°C) contenant 1000 mL

d'HBSS (*Hank's Balanced Salt Solution* – Gibco®) avec 1,25 g de trypsine (trypsine 1/250-BD®), 500 µL de CaCl₂, 500 µL de MgSO₄ et 500 µL de DNase, était ensuite filtrée (afin de la rendre stérile) afin de l'utiliser comme solution de « digestion ». Afin de réaliser cette étape, on prélevait 5 fois le poids de villosités obtenues en volume de solution de « digestion », et ce à chaque étape de digestion. La première « digestion » avait une durée de 30 minutes, puis les autres avaient toutes une durée de 10 minutes. Toutes ces « digestions » étaient réalisées à une température maintenue à 37°C. Quatre à 8 étapes de « digestion » étaient habituellement nécessaires afin de recueillir l'ensemble des CT, tout en évitant d'isoler des fibroblastes. Entre chaque digestion, un échantillon de surnageant était examiné au microscope optique afin de surveiller l'apparition des premiers CT. Dès l'apparition de ces derniers, le surnageant était collecté après filtration (pores de 40 µm), et mis en contact avec 5 mL de sérum de veau fœtal afin d'arrêter tout effet rémanent de la trypsine. Ces gestes étaient réalisés à chaque étape de digestion. Dès que le nombre de CT isolés semblait diminuer, la « digestion » était interrompue afin d'éviter d'isoler des fibroblastes qui pouvaient compromettre la réussite ultérieure des cultures.

L'ensemble des surnageants filtrés contenant (entre autres) les CT, était ensuite centrifugé pendant 10 minutes à 1200 rpm. Le culot ainsi obtenu était repris dans 3 mL de DMEN (*Dulbecco's Modified Eagle Medium* – Invitrogen®) associé de la pénicilline/streptomycine et de la glutamine sans sérum de veau fœtal (milieu sans sérum ou MSS), puis filtré (pore 40 µm). Ces 3 mL étaient ensuite déposés délicatement sur un gradient discontinu de Percoll® allant de 5 à 70%. Une centrifugation de 25 minutes à 2500 rpm permettait ensuite d'obtenir une « bande » contenant les CT, bande qui était prélevée et reprise dans du MSS. Après 10 minutes de centrifugation à 1200 rpm, le culot obtenu était finalement repris dans du DMEM + pénicilline/streptomycine + glutamine + sérum de veau fœtal (milieu complet) afin de réaliser un comptage sur lame de Malassez.

Les CT étaientensemencés dans des boîtes de Pétri de 60 mm à une densité de 3 millions de cellules/boîte, et 3 mL de milieu complet par boîte. Les cellules étaient maintenues dans une atmosphère humide à 37°C en présence de 5% de CO₂.

Chaque jour, une observation au microscope optique avait lieu afin de s'assurer de la bonne évolution de la culture, et le milieu était collecté (à des fins de dosage biologique d'hCG) et les CT étaient lavés par 3 rinçages d'HBSS à 37°C. A la fin des rinçages, les cellules étaient à nouveau incubées dans 3 mL de milieu complet.

La culture primaire de CT se déroulait en général sur 3 voire 4 jours maximum, du fait d'une mortalité cellulaire majeure au-delà.

3- Les marqueurs de fusion cellulaire et de formation du ST

Durant les 72h de culture, en cas de succès de celle-ci, les CT avaient tendance à s'accoler puis à fusionner pour former le ST (Figs. 24 et 25). Cette fusion cellulaire complexe (faisant intervenir la voie de l'AMPc entre autres) aboutissait à la sécrétion d'hCG (*human chorionic gonadotropin hormone*) et d'hPL (*human placental lactogen hormone*) (Pidoux et al. 2012).

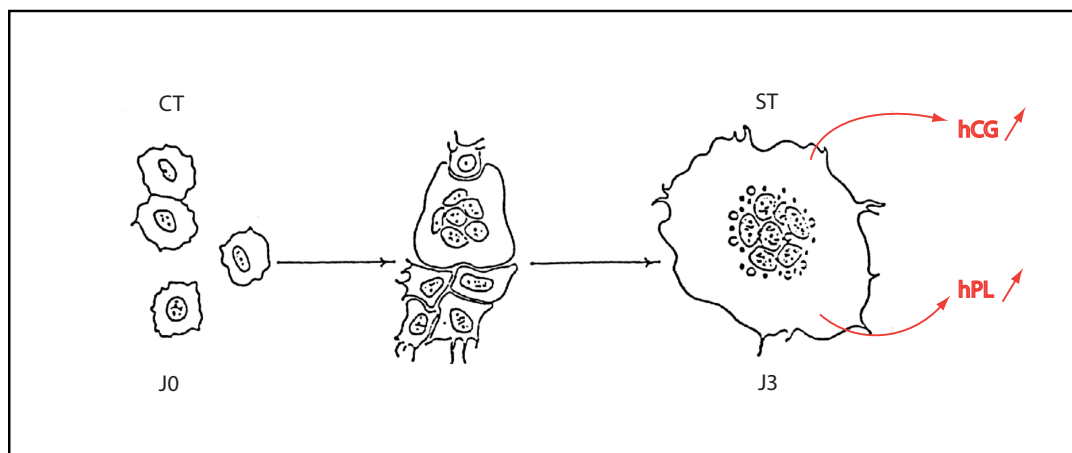


Figure 24: Représentation schématique de l'évolution morphologique des CT.

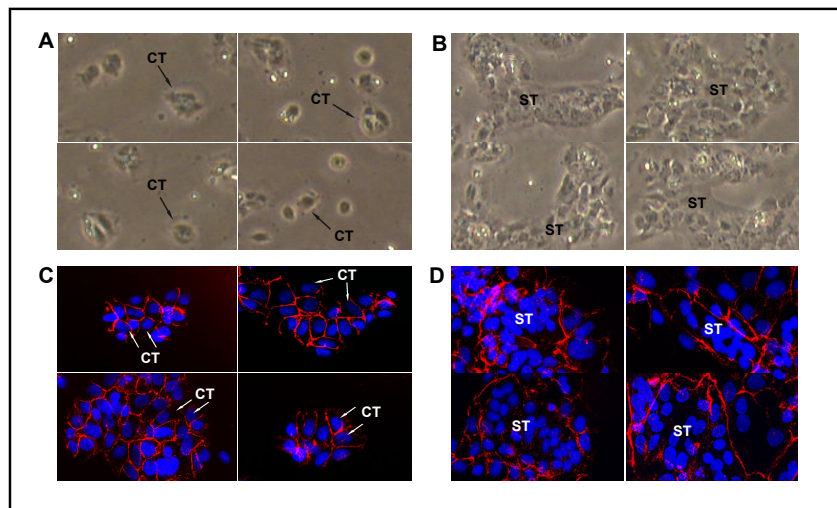


Figure 25: Vue microscopique et immunocytochimie réalisée sur une culture primaire de trophoblastes (issus de césarienne) montrant le phénomène de fusion entre 24 heures de culture (A et C) et 72 heures de culture à droite (B et D). (4',6'-diamidino-2-phénylindole (DAPI) en bleu et anti-desmoplakine en rouge).

Ainsi, afin de s'assurer de la bonne évolution de la culture (fusion des CT en ST en 72h), un dosage journalier des hCG était réalisé, ce dernier devant montrer une cinétique de croissance satisfaisante, conformément à l'expérience du laboratoire (Fig. 26).

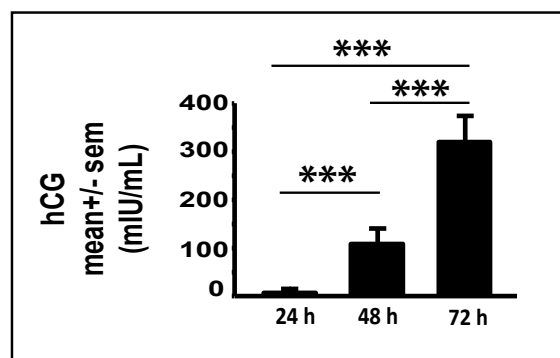


Figure 26: Evolution du taux d'hCG prélevés dans le milieu de culture de CT (issus de césarienne à terme).

Lorsque cette évolution biologique et morphologique était jugée satisfaisante, la culture était validée, et les cellules pouvaient être collectées en vue

d'expérimentations futures.

4- Etude de l'expression génique des différents transporteurs de médicament

Réalisation des culots en vue de l'étude transcriptionnelle

A chaque étape importante de la culture cellulaire (en général, au stade du CT et au stade du ST), un culot de plusieurs boîtes de Pétri était collecté afin d'étudier l'expression génique des différents transporteurs de médicaments.

Ainsi, après 24h (et 72h), la moitié des boîtes de Pétri contenant les cellules de cultures primaires étaient trypsinées (1,5 mL de trypsine / boîte – Trypsine 0,05% EDTA 1X – Gibco®), jusqu'à décollage des cellules. Les cellules décollées étaient ensuite centrifugées (1500 rpm pendant 10 minutes) et le surnageant éliminé. Le culot cellulaire était stocké ensuite à -80°C jusqu'à la prochaine étape d'étude des ARN.

Extraction des ARN

Le protocole utilisé était le suivant :

- Homogénéisation des culots avec 1 mL de TRIzol® (Invitrogen) à température ambiante, pendant 5 minutes.
- Puis ajout de 0,2 mL de chloroforme à la solution de TRIzol.
- Agitation des tubes pendant 15 secondes, puis incubation à température ambiante pendant 2 minutes.
- Centrifugation des tubes à 12 000g pendant 15 minutes, à 4°C.
- Récupération de la phase aqueuse contenant les ARN, et mise en place dans de nouveaux tubes.
- Afin de faire précipiter les ARN, ajout de 0,5 mL d'isopropanol (100%) puis incubation à température ambiante pendant 10 minutes.
- Centrifugation des tubes à 12 000g pendant 10 minutes, à 4°C.
- Elimination du surnageant en prenant soin de bien laisser le culot d'ARN (transparent).
- Rinçage du culot d'ARN avec 1 mL d'éthanol (75%) puis centrifugation à 7500 g

pendant 5 minutes à 4°C.

- Elimination du surnageant et séchage des tubes à l'air libre
- Mise en suspension des ARN dans 20 à 30 µL d'eau RNase-free.
- Incubation des tubes contenant les ARN à 60°C au bain-marie pendant 10 minutes, suivie d'une courte centrifugation à la paillasse.

Dosage des ARN – Vérification de l'absence de dégradation

- Après incubation au bain-marie, dosage de la quantité d'ARN au spectrophotomètre Nanodrop®.
- Réalisation d'une électrophorèse en gel d'agarose (50 mL de tris borate EDTA (TBE) avec 1g d'agarose puis 1 µL de bromure d'ethidium (BET)) avec chaque échantillon d'ARN associé à du bleu de charge, afin de vérifier leur pureté (présence des sous-unité 28S et 18S) et l'absence d'éventuelle dégradation (Fig. 27).

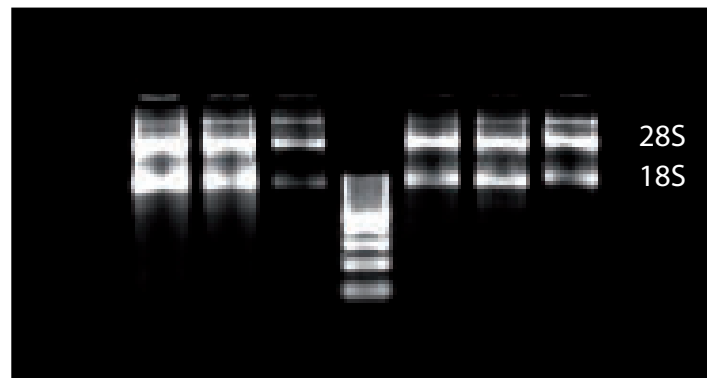


Figure 27: Exemple d'électrophorèse d'ARN montrant notamment la sous-unité 28S et la sous-unité 18S.

- En cas d'électrophorèse normale (présence de 28S et de 18S, absence de dégradation), les ARN pouvaient être utilisés pour la suite des expérimentations et ainsi être stockés à -80°C.

Réalisation de la PCR (Polymerase Chain Reaction) en temps réel (Fig. 28)

- Décongélation des tubes contenant les ARN totaux, puis maintien de ces derniers dans la glace durant la majeure partie de la manipulation.
- Préparation du mélange ayant pour but d'éliminer l'ADN génomique (ADNg) : incubation de 1000 ng d'ARN totaux avec 2 µL de 5x *ADNg elimination buffer* (Sabiosciences®) et d'eau *RNase free* QSP 10 µL. Puis incubation des échantillons à 42°C pendant 5 minutes dans un thermocycleur.
- Préparation du mélange de *reverse transcription* : le mélange comprenait 4 µL de BC3 (tampon 5X de *reverse transcription*), 1 µL de P2 (mélange de *primers*), 2 µL de RE3 (mélange d'enzyme de *reverse transcription*) et 3 µL d'eau *RNase free* pour un volume total de 10 µL. Ce mélange de *reverse transcription* était ajouté aux 10 µL d'ARN dépourvus d'ADNg obtenus précédemment. Puis incubation à 42°C pendant 15 minutes puis à 95°C pendant 5 minutes afin de stopper la réaction.
- 91 µL d'eau *RNase free* étaient ajoutés aux 20 µL ainsi obtenus d'ADNc.
- Préparation du mélange d'ADNc avec le MasterMix (Sabiosciences®) : 102 µL d'ADNc avec 550 µL de SYBER2X MasterMix (Sabiosciences) et 448 µL d'eau *RNase free*.
- Remplissage de la plaque de PCR 384 puits (10 µL de mélange par puits) à l'abri de la lumière.
- Centrifugation de la plaque à 2500 rpm pendant 5 minutes.
- Conservation de la plaque à l'abri de la lumière, en chambre froide, durant une nuit.
- Réalisation d'une PCR en temps réel le lendemain, à l'aide d'un thermocycleur *Applied Biosystems 7900 HT regular*®.

- Exploitation des résultats à l'aide du logiciel SDS 2.2.

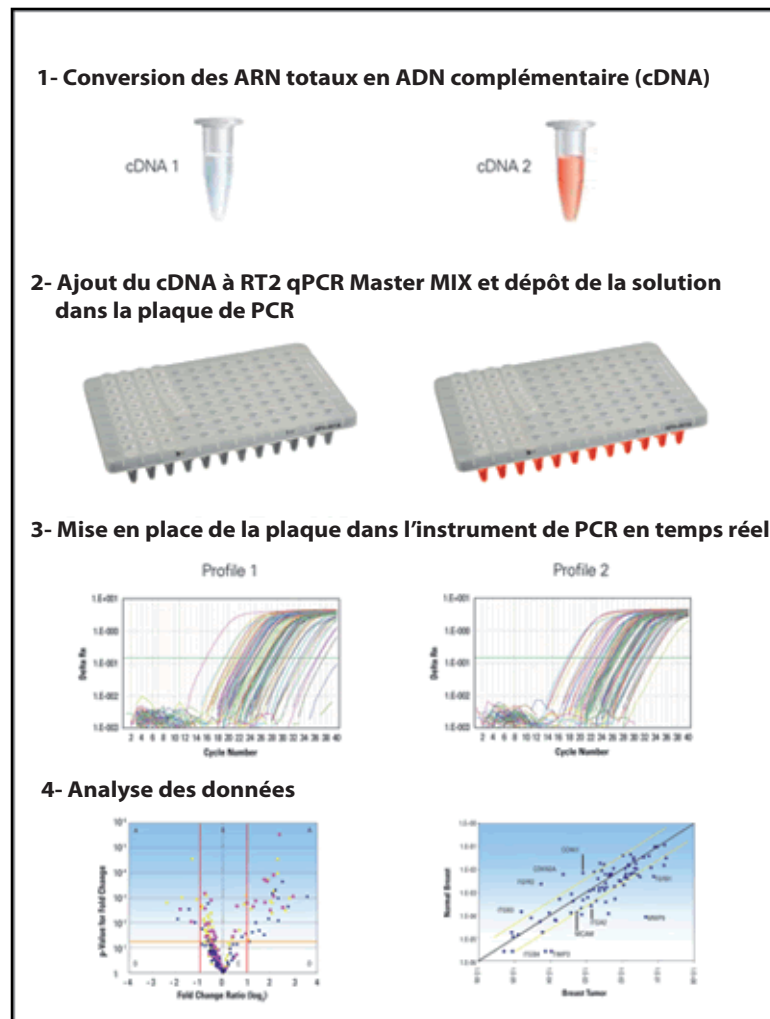


Figure 28: Figure résumant les différentes étapes de l'utilisation des plaques de PCR.
(Sabiosciences®)

5- Etude de l'expression protéique des différents transporteurs placentaires en fonction du terme de la grossesse, sur un modèle de culture primaire de trophoblastes

Récupération des culots cellulaires

- Durant la culture primaire de trophoblastes, des culots de cellules trophoblastiques étaient collectés à 24h et 72h en vue d'expérimentations futures.

- Toutes les étapes suivantes avaient lieu dans la glace.
- Afin de collecter un culot, les cellules trophoblastiques étaient d'abord lavées au PBS, tout en étant maintenues à 4°C.
- Puis les cellules étaient incubées avec 1 mL/boîte d'un mélange de PBS, d'antiprotéases et d'antiphosphatases (10 µL d'antiprotéases Calbiochem® et d'antiphosphatases Calbiochem® pour 10 mL de PBS).
- Grattage à l'aide d'un grattoir/récolteur de cellules.
- Aspiration de la solution contenant les cellules.
- Centrifugation à 1500 rpm pendant 10 minutes à 4°C.
- Elimination du surnageant et stockage du culot à -80°C.

Extraction protéique

- Mise en place des culots à 4°C (après conservation à -80°C).
- Préparation de 1000 µL de tampon de lyse (Mix InVitrogen®) (pour 10 échantillons de culots cellulaires), associés à 10 µL du Mix Antiprotéases Calbiochem®.
- Ajouter 100 µL de cette solution à chaque culot cellulaire.
- Homogénéisation douce à la pipette et au vortex, à 4°C.
- Centrifugation à 13000 rpm, pendant 10 min, à 4°C.
- Récupération du surnageant dans de nouveaux tubes Eppendorf.
- Dosage selon la méthode de Bradford (Bradford 1976) ou stockage à -80°C (en attendant le dosage).

Réalisation des western blots

- Après calcul des concentrations protéiques, un échantillon de 20 µg de protéines était utilisé dans chaque puits.
- Ajout à ces 20 µg de protéines, de 2 µL de tampon LDS (Glycérol 10%, Tris base 141 mM, Tris HCl 106 mM, LDS 2%, EDTA 0.51 mM, SERVA® Blue G250 0.22 mM, rouge phénol 0.175 mM, pH : 8.5), de 1 µL d'agent réducteur (2-mercaptoéthanol) et d'eau QSP 10 µL.
- Agitation douce des tubes (Vortex) puis centrifugation de paillasse.

- Dépôt des échantillons dans des gels précoulés InVitrogen® 3-8% ou 4-12%, avec un ou deux puits comportant le marqueur de taille.
- Migration à l'aide d'un courant de 80 V dans un premier temps, puis à 200 V jusqu'à la fin de la migration (utilisation d'un tampon de transfert adapté, tampon MOPS ou tris-acétate en fonction du gel précoulé).
- Récupération du gel, puis transfert liquide sur membrane de nitrocellulose sous un courant de 100V à l'aide d'un tampon de transfert comprenant du TGS (Tris-Glycine-SDS) associé à de l'éthanol et de l'eau.
- Récupération de la membrane de nitrocellulose puis saturation à l'aide de TBST (50 mM Tris – 150 mM NaCl – pH: 7,6 - polysorbate 20), de lait écrémé (5%) et d'azide, pendant une heure.
- Incubation avec l'anticorps primaire durant une nuit en chambre froide en agitation permanente.
- Rinçages au TBST pendant 30 minutes minimum.
- Incubation avec l'anticorps secondaire correspondant au 1/10 000 durant une heure à température ambiante, sous agitation constante.
- Rinçages au TBST pendant 30 minutes minimum.
- Révélation au Thermo Scientific SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate - Pierce® (2 mL par membrane), pendant 2 minutes.
- Lecture des clichés grâce à une développeuse en chambre noire.

Article 1

Utilisation de la méthode de culture primaire de trophoblastes humains afin d'étudier l'expression des transporteurs placentaires au cours de la grossesse.

Les transporteurs placentaires (de médicaments par exemple) peuvent interférer avec la biodisponibilité de ces mêmes substances en les transportant activement du compartiment maternel au compartiment fœtal, et inversement. Les informations concernant l'expression placentaire de ces transporteurs sont relativement peu étayées, et ce, plus particulièrement au premier trimestre de la grossesse. De plus, la méthodologie des modèles utilisés afin d'étudier ces mêmes transporteurs est matière à débats.

Ainsi, le but de notre étude était d'apporter pour la première fois une cartographie d'expression d'un large panel de transporteurs placentaires, et ce, tout au long de la grossesse (du premier au troisième trimestre de la grossesse). Pour ce faire, nous avons utilisé une méthode de culture cellulaire primaire de cellules trophoblastiques humaines purifiées.

Nous avons évalué l'expression protéique de deux transporteurs de médicaments largement décrits dans la littérature (ABCB1/P-gp et ABCG2/BCRP) à 24h et à 72h de culture (stade de CT et de ST, respectivement) à l'aide de western blot. Par ailleurs, nous avons localisé par immunohistochimie cette expression protéique au sein de villosités chorales issues de placentas de premier et de troisième trimestre de la grossesse.

Ainsi, nous avons montré en utilisant notre modèle que nos résultats confortaient ceux de la littérature. Puis, nous avons étudié l'expression transcriptionnelle de ces mêmes transporteurs sur ces trophoblastes issus de culture primaire, et ce au premier et au troisième trimestre de grossesse, afin de montrer que notre modèle était reproductible. Une fois réalisé, nous avons ensuite évalué l'expression transcriptionnelle d'un très

large panel de transporteurs placentaires, et ce par une méthode de RT-qPCR.

Nous avons montré dans cette étude que l'expression protéique de ABCB1/P-gp diminuait significativement dans le ST, aussi bien au premier trimestre qu'au troisième trimestre. A l'opposé, l'expression protéique de ABCG2/BCRP augmentait significativement dans les ST, et ce tout au long de la grossesse. Toutes ces données issues de western blot ont été confirmées par la suite par immunohistochimie.

Nous avons ensuite détaillé pour la première fois l'expression transcriptionnelle de plus de 80 transporteurs de médicaments tout au long de la grossesse, aussi bien au niveau des CT que des ST, afin de dresser une cartographie spatio-temporelle de ces transporteurs placentaires.

Au final, la culture primaire de trophoblastes humains représente un modèle hautement purifié tout à fait adapté afin d'étudier des protéines spécifiques telles que les transporteurs de médicaments. Cette importante cartographie spatio-temporelle des transporteurs placentaires est une base fondamentale et nécessaire afin de mieux comprendre le passage transplacentaire des médicaments en particulier, et ainsi, éventuellement d'optimiser l'utilisation de substances médicamenteuses durant cette période cruciale qu'est la grossesse.

Cette étude a été soumise dans *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2014.

Placental drug transporter expression during *in vitro* differentiation of first-trimester and term human trophoblasts.

Paul Berveiller^{1,2}, Séverine Degrelle^{1,2}, Nadine Segond^{1,2}, Henri Cohen⁴, Jean Guibourdenche^{1,2,3,5}, Danièle Evain-Brion^{1,2,3}, and Sophie Gil^{1,2,3}.

Affiliations

¹ INSERM, UMR-S1139, Paris, France

² Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France

³ PremUp Foundation, Paris, France

⁴ Department of Obstetrics and Gynecology, Institut Mutualiste Montsouris, Paris, France

⁵ Department of Hormonal Biology, Cochin teaching Hospital, Assistance Publique - Hôpitaux de Paris, Paris, France.

Correspondence to:

Professor Sophie Gil

INSERM UMR-S1139 - 4, Avenue de l'Observatoire - F75006 Paris, FRANCE.

Phone: 00 33 153 739 603 Fax: 00 33 144 073 992 E-mail: sophie.gil@parisdescartes.fr

Keywords: placenta; cytotrophoblast; syncytiotrophoblast; ABC transporters; SLC transporters.

Manuscript word count: 3997

Abstract word count: 200

Figures: 4

Tables: 4

Abstract (200 words)

Drug transporters interfere with drug disposition during pregnancy by actively transporting drugs from mother to fetus, and *vice versa*. Data on their placental expression during pregnancy are scarce. Here, we examined the expression of placental drug transporters in cultured primary trophoblastic cells isolated from first-trimester and term human placentas. Cytotrophoblastic cells (CT) were isolated from placentas and cultured for 72h to form syncytiotrophoblasts (ST). Expression of two major drug transporters, ABCB1/P-gp and ABCG2/BCRP, was analysed by Western blot in CT/ST and compared to *in situ* immunolocalization in placental sections. After validating our model, we determined mRNA expression of various drug transporters using RT-qPCR arrays.

Protein expression of ABCB1/P-gp was significantly lower in ST vs. CT (from both first- and last-trimester placentas), whereas ABCG2/BCRP expression was significantly higher in ST vs. CT. Immunocytochemistry confirmed the ST localization of ABCG2/BCRP, while ABCB1/P-gp was mainly detected at the apical surface of both CT/ST. We report the first data on the expression kinetics of more than 80 drug transporters during *in vitro* differentiation of trophoblastic cells isolated from different term placentas. This expression panel of placental drug transporters should help to understand transplacental drug transfer and to ensure more rational drug use during pregnancy.

Introduction

More than 400 human drug transporters have been identified, falling into two super-families: the ATP-binding cassette family (ABC transporters) and solute carrier transporters (SLC).¹ The role of the main transporters has been established *in vivo* in humans and knockout mice.²⁻⁶ These transporters handle both drugs and environmental toxins.

Some transporters are present in the human placenta.⁷⁻¹³ ABCB1/MDR1/P-glycoprotein (P-gp) and ABCG2/breast cancer resistance protein (BCRP) have been extensively studied because of their strong expression and potential role in fetal protection against a wide range of xenobiotics.

The human placenta regulates exchanges of nutrients, gases and various xenobiotics between the maternal and fetal circulations.¹⁴ The placenta also eliminates fetal waste, and its active hormonal function is crucial for normal pregnancy.^{14,15}

The chorionic villus is the structural and functional unit of the human placenta. The mesenchymal core of the chorionic villus including the fetal vessels is covered by cytotrophoblastic cells (CT), which form a monolayer of epithelial cells attached to the villous basement membrane. These cells differentiate by fusion to form a syncytiotrophoblast (ST), that covers the entire surface of the villus, which is immersed in maternal blood from the end of the first trimester of pregnancy.¹⁶ The ST plays a major role in fetomaternal exchanges throughout pregnancy, including ion, nutrient and gas exchanges, waste removal, and synthesis of steroid and peptide hormones required for fetal growth and development, such as human chorionic gonadotropin (hCG) and progesterone.^{17, 18} The multinucleated ST is regenerated

throughout pregnancy by a continuous turnover process, including proliferation of mononuclear CT followed by induction of early stages of apoptosis and fusion of these CT into ST. Throughout pregnancy, the CT cell layer evolves and becomes thinner: cuboid cells are transformed into flat cells with many cellular processes that, together with those of the adjacent ST, eventually cover the basal lamina in a complex network of interdigitations.^{19, 20}

Syncytiotrophoblast formation can be reproduced *in vitro* using various models. BeWo choriocarcinoma cells are able to fuse in the presence of cAMP to form a multinucleated syncytium, but do not undergo the last step of differentiation, the gathering of nuclei into a central mount. In addition, these transformed cells lack some trophoblastic functions²¹ and have a very different gene signature;^{21, 22} in particular, some major drug transporters such as P-gp are not expressed.^{21, 23}

In contrast, purified villous CT cultured on plastic dishes can be used to follow the morphological and functional differentiation of villous CT.²⁴ In this model, mononucleated villous CT leave the proliferative stage, adhere to the plastic substrate, aggregate, establish efficient communication and signal exchanges, and fuse to form a multinucleated ST.^{25, 26} The resulting ST produces specific hormones such as human chorionic gonadotropin (hCG).

Few data are available on placental drug transporters and their localization in the human placenta.^{7-11, 18} In addition, several studies have used total placental extracts and/or choriocarcinoma cell lines.

Thus, here we aimed to assess drug transporter expression during *in vitro* differentiation of CT into ST, the CT being isolated from first-trimester and term

human placentas. We used a quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-qPCR)-based drug transporter array (SABiosciences, Frederick, MA) to examine mRNA expression of 84 pharmaceutically relevant transporters.

For Peer Review

Materials and methods

Placental tissue collection and trophoblast cell culture

Placental tissues were obtained from the Department of Obstetrics and Gynaecology of the Mutualiste Montsouris Institute. First-trimester placentas (7-12 WG) were obtained after voluntary surgical abortion, with the patients' written informed consent and approval from our local ethics committee (CCPPRB, Paris Cochin, N°18-05, Paris, France).

The tissue was washed in $\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+}$ -free HBSS (Hank's balanced salt solution) supplemented with 100 IU/mL penicillin and 100 $\mu\text{g/mL}$ streptomycin. Chorionic villi were dissected and rinsed before cell isolation or storage at -80°C . CT isolation was based on the methods of Kliman et al.²⁴ as modified by Tarrade et al.²⁷ and Handschuh et al.²⁸ Our method has recently been described in detail.²⁹ Briefly, villous CT were isolated by sequential trypsin digestion and purified by Percoll gradient fractionation. Cytotrophoblasts were subsequently diluted to 1.25×10^6 cells/mL in DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) supplemented with 10% FCS (fetal calf serum), 2 mM glutamine, 100 IU/mL penicillin and 100 $\mu\text{g/mL}$ streptomycin, and plated at 150 000 cells per cm^2 on 60-mm TPP culture dishes (TPP, Trasadingen, Switzerland). After 2 h of culture with 5% CO_2 at 37°C , CT were carefully washed twice to eliminate non-adherent cells. Purified CT were characterized by CK7 immunolabelling and by their ability to aggregate after 48 h of culture and to form an ST after 72 h of culture, as we have previously described.²⁵ Cells were finally trypsinized, harvested and pelleted, then frozen at -80°C until protein or RNA extraction.

For third-trimester trophoblast cell culture, placentas were immediately obtained after caesarean section from healthy mothers with uncomplicated pregnancies delivered at 37–41.6 WG. Cytotrophoblast cells were isolated as previously described.^{30, 31}

After sequential trypsin/DNase I digestion followed by Percoll gradient centrifugation, CT were diluted to a final density of 3×10^6 cells in 3 mL of minimum essential medium containing 10% FCS. Cells were plated in 60-mm plastic dishes (TPP, Trasadingen, Switzerland) and incubated at 37°C with 5% CO₂.

Cytokeratin 7 immunocytochemistry was used to confirm that attached cells were CT: 95–98% cells stained positively.

Hormone assay

The human chorionic gonadotropin (hCG) concentration was determined in cell culture supernatant after 24, 48 and 72 h of culture by using an enzyme-linked fluorescence assay (Vidas System, BioMerieux, Marcy l'Etoile, France) with a detection limit of 2 mIU/mL. Values are reported as means \pm SEM of triplicate determinations in four independent experiments.

RNA extraction

Total RNA was extracted from primary trophoblast cells from term- and first-trimester placentas after 24 h and 72 h of culture (n=4), using the TRIzol reagent according to the manufacturer's instructions (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA). RNA was dissolved in 20 μ L of ultrapure water and quantified in terms of UV absorbance at 260 nm (Nanodrop 1000, Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE). Purity was confirmed by gel electrophoresis.

Transporter RT-qPCR arrays

PAHS-070 transporter RT-qPCR arrays (SABiosciences, Frederick, MA) profiling the expression of 84 SLC and ABC transporter member sequences that are relevant to drug ADME were used for primary CT cells after 24 h of culture and for ST cells after 72 h of culture (first-trimester and term placentas, n=4 each). Complementary DNAs were prepared with the SABiosciences RT² first strand kit (SABiosciences, Frederick, MA) according to the manufacturer's protocol. RT-qPCR was performed using the SYBR Green Master Mix (SABiosciences, Frederick, MA). All RT-qPCR arrays were run in duplicate for each gene. Real-time PCR was run on an ABI Prism 7900HT Fast Detection System (Applied Biosystems, Life technologies, Foster City, CA) in a 384-well format PCR array. An initial denaturation step at 95°C for 10 min was followed by 40 cycles at 95°C for 15 s and 60°C for 1 min, and by a three-step dissociation phase of 15 s at 95°C, 30 s at 60°C and 15 s at 95°C to eliminate possible artefacts.

Immunoblotting

Cell extracts were prepared as previously described.³² Protein (20 µg) was solubilized in radioimmunoprecipitation assay (RIPA) buffer (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1% NP-40, and 50 mM N-octyl-D-glucoside, pH 8), with protease and phosphatase inhibitors (Calbiochem, San Diego, CA), then separated on 4-12% and 3-8% SDS-PAGE gels and transferred to nitrocellulose membranes.

The membranes were immunoblotted with primary antibodies against human ABCB1/MDR1/P-glycoprotein (P-gp) [sc-55510-Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA] and human ABCG2/BCRP (breast cancer resistance protein) [MAB4146 – Millipore, Billerica, MA]. The specific bands were revealed by chemiluminescence

(West Pico Chemiluminescent, Pierce, Rockford, IL) after incubation with the corresponding peroxidase-coupled antibody (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA). GAPDH was used as housekeeping control. The membranes were immunoblotted with a mouse polyclonal anti-GAPDH antibody (Sigma, Saint Louis, MO) and detected with an peroxidase-coupled anti-mouse antibody.

Immunohistochemistry

Immunohistochemistry was performed on human placental biopsy specimens. Tissue samples from first-trimester placentas were first fixed in 4% paraformaldehyde (PFA) for 4 h followed by 1% PFA for 16 h, then embedded in 4% agarose. Blocks were cut into 120- μ m-thick sections using a vibratome (Technical Products International) then washed three times in phosphate buffered saline (PBS) and incubated in 0.5% Triton X-100 for 30 minutes. They were then washed 5 times in PBS and incubated in a blocking solution consisting of 1% Triton X-100, 3% bovine serum albumin (BSA) and 7% donkey serum (1:500; Jackson ImmunoResearch, Baltimore, MD) in PBS at room temperature for 4 h. Primary antibodies [monoclonal anti-P-gp, 1 μ g/ml; Santa-Cruz Biotechnology Europe; monoclonal anti-BCRP, clone BXP21, 1 μ g/ml; Chemicon; and polyclonal rabbit anti-CK7, 2 μ g/ml; Sigma, Saint-Louis, MO] were prepared in PBS with 1% BSA and incubated with tissue samples overnight at 4°C. The sections were then washed with PBS-0.05% Triton-X100 and with the appropriate fluorochrome-conjugated secondary antibody (anti-mouse Alexa Fluor 488 [1:500; Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA] and anti-rabbit TRITC [1:400; Jackson Immunoresearch, Baltimore, MD]) for 2 hours. After washing, the sections were incubated in PBS with TO-PRO-3 (1:500; Invitrogen, Paisley, UK) for 45 minutes at room temperature for nuclear staining, then rapidly washed with PBS

and mounted in Dako fluorescent mounting medium (Dako, Glostrup, Denmark) for confocal microscopy (Leica TCS SP2). Controls without the primary antibody or with non-specific IgG of the same isotype were all negative.

Statistical analysis

PCR array data (Ct) were uploaded into the data analysis template on the manufacturer's website at <http://www.sabiosciences.com/pcr/arrayanalysis.php>. The RNA expression of each gene was normalized to that of five housekeeping genes (beta-2 microglobulin, beta-actin, hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1, ribosomal protein L13a [RP L13a], and glyceraldehyde-3 phosphate dehydrogenase [GAPDH]). The relative expression of each gene was calculated on the website by using the $\Delta\Delta C_t$ method. Differences between groups were analysed with Student's two-tailed *t* test, along with their 95% confidence interval. Genes with 2-fold differences in expression and *p* values below 0.05 were considered to be significantly different.

Western blot studies were performed in triplicate and analysed with the StatView F-4.5 software package (Abacus Concepts, Inc., Berkeley, CA). Differences between groups were evaluated with Student's unpaired *t* test or ANOVA, as appropriate. Post hoc analysis (Tukey) was used for individual comparisons and to generate the *p* values shown in the figure legends. All data are presented as means \pm SEM unless otherwise stated. *P* values < 0.05 were considered statistically significant.

Results

In vitro morphological and functional differentiation of cytotrophoblastic cells isolated from first-trimester and term human placentas

Mononucleated CT isolated from first-trimester and term placentas aggregate and fuse to form a syncytiotrophoblast (ST) after 72 h of culture (Fig. 1.A-B-C-D)²⁴. *In vitro* ST formation was associated with an increase in hCG secretion in the culture medium, from 21.2 ± 3.3 at 24 h to 690.9 ± 132.2 mIU/mL/ 10^6 cells at 72 h for cells from first-trimester placentas (Fig. 1.E), and from 2.2 ± 0.2 mIU/mL/ 10^6 cells at 24 h to 106.4 ± 17.9 mIU/mL/ 10^6 cells at 72 h for cells from term placentas (Fig. 1.F).

Expression of ABCB1/P-gp and ABCG2/BCRP in cultured trophoblastic cells

Western blots of ABCB1/MDR1/P-gp and ABCG2/BCRP are shown in Fig. 2-3. Interestingly, ABCB1/P-gp expression was significantly lower in ST than in CT, with cells from both first-trimester and term placentas ($p=0.001$ and $p=0.017$ respectively; Fig. 2.A-B and 3.A-B). Conversely, ABCG2/BCRP expression was significantly higher in ST than in CT, again with cells from both first-trimester and term placentas ($p=0.005$ and $p \leq 0.001$; Fig. 2.A-C and 3.A-C).

Immunolocalization of ABCB1/P-gp and ABCG2/BCRP in placental villi from first-trimester placentas

1
2
3
4
5 In order to compare *in vitro* data and *in situ* expression of these two transporters, we
6
7 focused immunohistochemistry in human first-trimester placentas. Indeed the
8
9 observation of CT cell layer is easier. As illustrated by CK7 immunolabelling, CT are
10
11 cuboid cells which form a distinct cell layer covered by the ST (Fig. 4.A). ABCB1/P-
12
13 gp was mainly located at the apical surface of CT and ST (Fig. 4.A [arrows]).
14
15 Conversely, ABCG2/BCRP was mainly found at the apical surface of ST (microvilli)
16
17 (Fig. 4.B [arrows]).
18
19

20
21
22
23 *Expression pattern of drug transporters during differentiation of human*
24
25 *cytotrophoblastic cells isolated from first-trimester and term placentas*
26
27

28
29
30 Expression of 84 selected drug transporters was investigated by quantitative PCR in
31
32 trophoblast cells from first-trimester and term placentas after 24 h (CT) and 72 h (ST)
33
34 of culture. Semi-quantitative data are summarized in Tables 1 to 3. The corresponding
35
36 genes are divided in ABC transporters (Table 1) and SLC transporters (Table 2), and
37
38 are provided with their alternative names and their substrates (non exhaustive list).
39
40

41
42
43 Interestingly, expression of most of the studied drug transporter genes was detected in
44
45 purified trophoblastic cells from first-trimester and term human placentas. However,
46
47 as shown in Table 3, we failed to detect the expression of a few SLC genes (SLC5A4,
48
49 SLC22A6, SLC22A8, SLC28A1, SLCO1B1) and two ABC genes, ABCB5 and
50
51 ABCC12. Moreover, expression of some ABC transporter genes (ABCA2, ABCA3,
52
53 ABCA13, ABCB11, ABCC6, ABCC11 and ABCG8) was low or very low ($C_t > 30$),
54
55 independently of trophoblast differentiation and the term of pregnancy (Table 1).
56
57
58
59
60

Weakly expressed SLC transporter genes included SLC2A2, SLC5A1, SLC15A1, SLC22A6, SLC22A7, SLC22A9, SLC28A1 and SLC28A2 (Table 2).

As shown in Table 1, the following ABC transporters genes were strongly or very strongly expressed ($22 \leq Ct < 27$ and $Ct < 22$, respectively), independently of trophoblast differentiation and the term of pregnancy: ABCA1, ABCA12, ABCB1/P-gp, ABCB3, ABCB6, ABCC1/MRP1, ABCC5/MRP5, ABCD1, ABCD3, ABCF1 and ABCG2/BCRP (Table 1). The following SLC transporter genes were strongly expressed: SLC2A1, SLC2A3, SLC3A1, SLC3A2, SLC7A5, SLC7A6, SLC7A7, SLC7A8, SLC7A11, SLC16A1, SLC16A2, SLC19A2, SLC19A3, SLC22A4, SLC22A5, SLC22A11, SLC 25A13, SLC29A1, SLC29A2, SLC31A1, SLC38A2, SLCO2A1 and SLCO4A1 (Table 2).

Variations in gene expression between CT and ST, in first-trimester and term placentas

Table 4 summarizes significant differences in drug transporter gene expression observed between CT and ST in first-trimester and term placentas (Table 4). A total of 12 genes were significantly up- or down-regulated in first-trimester placentas during trophoblast differentiation. ABCA3, ABCC3, SLC2A3, SLC7A7, SLC22A6, SLCO2A1 and SLCO2B1 were up-regulated, while ABCB4, ABCG8, SLC7A5, SLC15A2 and SLC16A2 were down-regulated.

In term placentas, 18 genes were significantly up- or down-regulated during trophoblast differentiation. Interestingly, most of them were significantly induced, and included those found during trophoblast differentiation in first-trimester placentas, except for SLC22A6: ABCA1, ABCA2, ABCA3, ABCB1, ABCC3, ABCC5,

ABCC11, ABCD4, ATP7A, SLC2A3, SLC7A7, SLC7A8, SLC22A9, SLCO2A1, SLCO2B1 and SLCO4A1.

Only SLC7A5 and SLC16A2 were significantly down-regulated during trophoblast differentiation in term placentas.

We also compared gene expression between CT isolated from first-trimester and term placentas. Compared to first-trimester placentas, 17 genes were significantly up- or down-regulated in term placentas. Only ABCA9, ABCA12, AQP9 and SLC7A7 were up-regulated, while ABCA3, ABCC4, ABCG8, AQP1, SLC2A3, SLC7A5, SLC7A8, SLC15A1, SLC16A3, SLC22A3, SLC38A5, SLCO2A1 and SLCO4A1 were down-regulated.

Finally, we compared gene expression between ST isolated from first-trimester and term placentas. Twenty-five genes were significantly up- or down-regulated. The following genes were up-regulated in term placentas: ABCA9, ABCA12, ABCC2, ABCC5, ABCC10, ABCD4, AQP9, ATP7A, SLC2A2, SLC3A1, SLC5A4, SLC15A2, SLC19A2, SLC19A3, SLC28A3 and SLCO2B1, while ABCA13, AQP1, SLC2A3, SLC7A5, SLC15A1, SLC16A2, SLC22A3, SLC38A5 and SLCO2A1 were down-regulated.

Discussion

This is the first study to provide a broad expression profile of human drug transporters genes during *in vitro* differentiation of purified human cytotrophoblastic cells isolated from first-trimester and term placentas into ST. Most previous studies focused on a small number of ABC transporters, (essentially ABCB1, ABCC1-3 and ABCG2) and/or used placental tissue or homogenates, which contained not only trophoblast cells but also fetal mesenchymal/endothelial cells and maternal “components”. This could lead to potential biases in transcriptional or protein studies as previously described for superoxide dismutase in human placenta for instance.^{30,33} Similarly, for the same reasons, the frequent use of immortalized cell lines such as BeWo, Jeg or Jar which are transformed cells with very different gene signature may therefore induce some comparable biases.^{21,22} Interestingly, Serrano et al. compared drug transporters expression levels between isolated human trophoblasts and different cell lines such as BeWo, Jeg-3 and Jar.³⁴ Thus, significant differences of expression were found between different experimental models. As an illustration, level of mRNA expression for BCRP varied up to five-fold in human trophoblasts vs. BeWo cells.³⁴

In order to set up a physiological model allowing ST formation *in vitro*, we used a mechanical and enzymatic isolation method developed and validated in our laboratory to isolate purified human cytotrophoblastic cells from first-trimester^{27-29,35} and term placentas.^{30,31,36,37} We first checked in this model the ABCB1/P-gp and ABCG2/BCRP protein expression and compared the *in vitro* data with the immunolocalization *in situ*.

We found that *in vitro* ABCB1/P-gp protein expression declines in the ST compared

1
2
3 to the CT in term placentas, confirming data from Atkinson et al. and Evseenko et
4 al.^{23, 38} We therefore provided original information since we found a significant
5
6 decrease in ABCB1/P-gp expression, between 24h and 72h of culture, whereas
7
8 ABCG2/BCRP expression increased significantly not only in term placentas but also
9
10 in first-trimester placentas.
11
12
13
14

15 Immunohistochemistry was applied to first-trimester placentas to study ABCB1/P-gp
16 and ABCG2/BCRP localization and thus to characterize the CT/ST interface.
17 Placental samples were fixed in agarose and not dehydrated in order to preserve the
18 3D-structure of the villi and thus to facilitate confocal microscopy. Using this
19 approach, we showed that ABCG2/BCRP was predominantly expressed on the apical
20 surface of ST of first-trimester placentas in agreement with previous
21 immunohistological studies.³⁹ This localization matched that seen in cultured
22 trophoblastic cells analyzed by Western blot. ABCB1/P-gp was mainly found on the
23 apical CT membrane facing the ST and on the apical membrane of the ST. Western
24 blot analysis of cultured cells showed higher ABCB1/P-gp expression in the CT than
25 in the ST. Nakamura et al. reported ABCB1/P-gp expression in both CT and ST,⁴⁰
26 whereas Sun et al. found a marked immunoreactivity in ST.⁴¹ Discrepancies between
27 studies might be explained by the use of different methods of tissue fixation
28 (dehydration, use of solvents) and different antibodies.
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45

46 In this model of purified human trophoblastic cells in culture, few drug transporter
47 genes were not expressed by CT or ST throughout pregnancy. Indeed, we failed to
48 detect the expression of ABCB5, ABCC12, SLC5A4, SLC22A6, SLC22A8,
49 SLC28A1 or SLC01B1 mRNAs. Most of these receptors are reported to be absent in
50 human placenta or expressed at very low levels, suggesting that they might be
51 expressed in other cells of the placenta such as fibroblasts, macrophages, endothelial
52
53
54
55
56
57
58
59
60

cells or maternal blood cells.^{23, 38}

Most of the drug transporter genes belonging to the ATP-binding cassette family including the extensively studied ABCB1, ABCC1, ABCG2 or to the SLC family were strongly expressed in purified trophoblastic cells throughout pregnancy. Most of them are ubiquitously expressed apart from ABCA12. ABCA12 is a keratinocyte transmembrane lipid transporter essential for keratinocyte differentiation and skin barrier formation.⁴² The role of this transporter in the placenta is unknown. Sphingolipids such as ceramides and their metabolites (including glucosylceramide, a substrate of ABCA12) mediate cell differentiation/apoptosis and could thus play a role in syncytialization.

Interestingly, ABCF1 mRNA, which was expressed at the highest level (Ct<22) in trophoblastic cells from first-trimester and term placentas, has also been found to be strongly expressed in human pooled placentas.⁴³ ABCF1 is a protein that stimulates the formation of complexes between eIF2, GTP and Met-tRNA.⁴⁴ Recently, it was shown that ABCF1 overexpression modulates sensitivity to endoplasmic reticulum stress.⁴⁵ Endoplasmic reticulum stress disrupts human placenta morphogenesis suggesting a key role of this transporter in human placental pathology.⁴⁶

Our transcriptional study confirmed the very strong mRNA expression of some of SLC transporters family such as *SLC2A1*, *SLC3A2*, *SLC7A5*, *SLC19A2*, *SLC22A11* and *SLC38A2*, according with previous studies (Table 3).^{43, 47} These transporters are ubiquitously expressed except for *SLC22A11/OAT4* mRNA, which is expressed at high mRNA levels in kidney and placenta, with no expression in other tissues³⁸. In the placenta, *SLC22A11/hOAT4* takes up sulfated C19-steroid precursors for placental estrogen synthesis.^{48, 49} *SLCO2A1* is widely expressed in various tissues and seems to be involved in prostaglandin transport.⁵⁰ Prostaglandins play an important role during

pregnancy since mutations in SLC02A1 transporter had been found to be correlated with various fetopathies such primary hypertrophic osteoarthropathy for example.⁵¹

This transporter was highly expressed in first-trimester ST. Similarly *SLC15A1* expression in whole placenta was reported by Nishimura et al.⁴³ In this study, decreasing expression of *SLC15A1* in CT and in ST during advancing gestation indicates that this transporter could play a role preferentially at earlier stages of gestation. Still, the role and relevance of these SLC family members remain to be elucidated in placenta.

Throughout pregnancy, the ST which forms the outer layer of the villous, faces the maternal compartment, bathing in maternal blood at the end of the first trimester of pregnancy.⁵² During the first-trimester, the CT forms a monolayer of epithelial cells attached to the villous basement membrane, facing on one side the fetal tissue. The CT layer decreases at term eventually leaving a reorganization of membranes that cover the basal lamina in a complex network of interdigitations.^{19, 20}

These morphological modifications might be associated with a distinct functional role of the CT throughout pregnancy. For instance it is well established that during the first trimester of pregnancy, an adequate supply of maternal thyroid hormones (TH) must be sustained to ensure normal neurological development.⁵³ Indeed, the fetal TH becomes able to accumulate iodide and to synthesize TH by the 12-13th WG.⁵⁴ We observed in this study that SLC16A2 was strongly expressed in the CT as compared to ST. SLC16A2 expression is essential for uptake of T3 and strongly specific for TH.⁵⁵ Inactivating mutations in this monocarboxylate transporter 8 (MCT8/SLC16A2) lead to psychomotor retardation and abnormal serum TH concentrations.⁵⁶ Iodide available for the fetal thyroid gland results from circulating maternal iodide and deiodination of iodothyronines within the placenta. The placenta assumes the passage

of iodide through the two iodide transporters, the sodium/iodide symporter NIS and Pendrin, both localized in the trophoblast.^{57,58} We have shown that iodide transporters expression varies also with the length of gestation and *in vitro* trophoblast differentiation. In first-trimester trophoblastic cells, high expression of NIS in CT suggest a possible role of NIS in the iodine transport to the fetus.

Only four drug transporters were found to be up-regulated in CT throughout pregnancy (*ABCA9*, *ABCA12*, *AQP9* and *SLC7A7*) while 13 were down-regulated.

In contrast, at the end of pregnancy, many drug transporters genes (17) are up-regulated in ST along pregnancy illustrating the predominant role of the syncytiotrophoblast, facing the maternal compartment and bathing in the maternal blood, in placental exchanges.

This study, conducted in a physiological model of human trophoblastic cells, suggests also a potential significant role of some transporters in human trophoblast differentiation and/or functions. ABCA3 transporter plays a major in transport of phosphatidylglycerol, a precursor of lysobisphosphatidic acid synthesis which is a unique lipid enriched in the internal membranes of organelles. Late endosomal membranes rich in lysobisphosphatidic acid regulate cholesterol transport.⁵⁹ Although ABCA3 expression was low in our study (Table 1), to our knowledge, its expression in the human placenta was never described.

OCT3, an extraneuronal monoamine transporter, is encoded by the *SLC22A3* gene. In all species tested, OCT3 shows a very high expression in placenta, suggesting OCT3 to be a “placenta-specific” OCT. Verhaagh et al., and more recently, Ahmadimoghaddam et al., described a decreased expression of OCT3 in human

1
2
3 placenta towards the end of gestation.^{60, 61} For the first time, using purified
4 trophoblastic cells, we showed a total disappearance of SLC22A3 gene expression,
5
6
7 not only in CT during advancing gestation, but also in ST.
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

For Peer Review

Conclusion

In conclusion, our present study confirms that primary human trophoblast culture is a purified model that seems to be strongly adapted to study specific proteins such as placental drug transporters. Hence, human placenta is equipped with various drug transporters that display many transcriptional expressions. These different expression profiles may vary with gestational age and/or trophoblast differentiation stage. Our results are mainly in line with previous studies from the literature, and provide novel and interesting “expression cartography” of trophoblast drug transporters. This original “expression cartography” is expected to be valuable for better understanding transplacental transfer and better handling drugs during pregnancy. Nevertheless, further studies are warranted to confirm our original results and therefore access the potential repercussions of these expression variations during pregnancy.

Acknowledgments

We would like to sincerely thank Bruno Saubamea for his important advices. We are grateful to Fatima Ferreira and Audrey Chissey for expertise in trophoblastic cell cultures and immunohistochemistry studies, respectively. We would like to sincerely thank Guillaume Pidoux and Pascale Gerbaud for helpful discussion.

For Peer Review

Figure legends**Figure 1: *In vitro* model of human cytotrophoblast differentiation.**

Scheme of floating chorionic villi and *in vitro* human trophoblast differentiation:

1.A: Morphological differentiation of isolated cytotrophoblast (CT) cultured on plastic dishes and observed in optic microscopy. After one day, pseudopodia of CT are making contact with neighbouring CT, progressively forming syncytiotrophoblast (ST). Scale Bar: 20 μ m

1.B: After three days, large ST are observed with central nuclear mounts (optic microscopy). Scale Bar: 30 μ m

1.C: The isolated CT were visualized by immunostaining with an anti-desmoplakin monoclonal antibody. Nuclei were counterstained by DAPI. Scale Bar: 20 μ m

1.D: At 72 h, normal CT had fused, as immunofluorescence staining of the cell boundaries disappeared, owing to the formation of a large syncytium containing many nuclei. Scale Bar: 30 μ m

1.E: Levels of hCG secreted into the culture medium of trophoblast cells isolated from first-trimester placentas and cultured for 3 days (n=4).

1.F: Levels of hCG secreted into the culture medium of trophoblast cells isolated from term placentas and cultured for 3 days (n=4).

Figure 2: ABCB1/P-gp and ABCG2/BCRP drug transporters protein expression in first-trimester trophoblast cells (cytotrophoblast; CT) cultured for 72 h to form a syncytiotrophoblast (ST).

Immunoblot analysis of protein fraction was performed using primary antibodies against human ABCB1/MDR1/P-glycoprotein (P-gp) [sc-55510 - Santa Cruz Biotechnology®, Santa Cruz, CA] and human ABCG2/BCRP (breast cancer resistance protein) [MAB4146 – Millipore®, Billerica, MA]. Histogram represents the levels of ABCB1 and ABCG2 normalized to GAPDH levels in the same blots. Results are expressed as the mean \pm SEM of four different cultures. (*: $p \leq 0.05$; **: $p \leq 0.005$; ***: $p \leq 0.001$).

Figure 3: ABCB1/P-gp and ABCG2/BCRP drug transporters protein expression in term placenta trophoblast cells cultured for 72 h to form a syncytiotrophoblast.

Western blot analysis of protein fraction was performed using primary antibodies against human ABCB1/MDR1/P-glycoprotein (P-gp) [sc-55510 - Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA] and human ABCG2/BCRP (breast cancer resistance protein) [MAB4146 – Millipore, Billerica, MA]. Histogram represents the levels of ABCB1 and ABCG2 normalized to GAPDH levels in the same blots. Results are expressed as the mean \pm SEM of four different cultures. (*: $p \leq 0.05$; **: $p \leq 0.005$; ***: $p \leq 0.001$).

Figure 4: Immunohistochemistry – Localization of ABCB1/P-gp and ABCG2/BCRP during the first trimester of pregnancy.

Immunohistochemical analysis of ABCB1/P-gp and ABCG2/BCRP in chorionic villi of first-trimester placentas. Placental tissue sections were fixed and immunostained with monoclonal anti-P-gp (1 µg/ml; Santa-Cruz Biotechnology Europe), monoclonal anti-BCRP (clone BXP21, Chemicon, 1 µg/ml) or only with secondary antibodies.

4.A. (Upper panels): floating chorionic villous: ABCB1/P-gp immunostaining was mainly observed at the apical membrane of the CT. Control cells incubated with secondary antibodies alone showed no staining (control). Scale Bar: 50 µm

4.B. (Lower panels): floating chorionic villous: ABCG2/BCRP was mainly observed in the apical membrane of ST (brush border) whereas immunoreactivity was extremely low in CT. Control cells incubated with secondary antibodies alone showed no staining (control). Scale Bar: 50 µm

Table legends

Table 1: Trophoblast expression of ABC transporters during the first- and the third trimesters of pregnancy.

Table 2: Trophoblast expression of SLC transporters during the first- and the third trimesters of pregnancy.

Table 3: Non-expressed ABC- and SLC-transporters during the first- and the third- trimesters of pregnancy.

Table 4: Significant differences in up/down-regulated genes between CT and ST in first-trimester and term placentas.

References

1. Giacomini KM, Huang SM, Tweedie DJ, et al. 2010. Membrane transporters in drug development. *Nat Rev Drug Discov* 9:215-236.
2. Cascorbi I. 2006. Role of pharmacogenetics of ATP-binding cassette transporters in the pharmacokinetics of drugs. *Pharmacol Ther* 112:457-473.
3. Sissung TM, Gardner ER, Gao R, Figg WD. 2008. Pharmacogenetics of membrane transporters: a review of current approaches. *Methods Mol Biol* 448:41-62.
4. Maeda K, Sugiyama Y. 2008. Impact of genetic polymorphisms of transporters on the pharmacokinetic, pharmacodynamic and toxicological properties of anionic drugs. *Drug Metab Pharmacokinet* 23:223-235.
5. Jonker JW, Wagenaar E, Van Eijl S, Schinkel AH. 2003. Deficiency in the organic cation transporters 1 and 2 (Oct1/Oct2 [Slc22a1/Slc22a2]) in mice abolishes renal secretion of organic cations. *Mol Cell Biol* 23:7902-7908.
6. Schinkel AH, Mol CA, Wagenaar E, Van Deemter L, Smit JJ, Borst P. 1995. Multidrug resistance and the role of P-glycoprotein knockout mice. *Eur J Cancer* 31A:1295-1298.
7. Vahakangas K, Myllynen P. 2009. Drug transporters in the human blood-placental barrier. *Br J Pharmacol* 158:665-678.
8. Iqbal M, Audette MC, Petropoulos S, Gibb W, Matthews SG. 2012. Placental drug transporters and their role in fetal protection. *Placenta* 33:137-142.
9. Staud F, Cerveny L, Ceckova M. 2012. Pharmacotherapy in pregnancy; effect of ABC and SLC transporters on drug transport across the placenta and fetal drug exposure. *J Drug Target* 20:736-763.
10. Eshkoli T, Sheiner E, Ben-Zvi Z, Holcberg G. 2011. Drug transport across the placenta. *Curr Pharm Biotechnol* 12:707-714.
11. Prouillac C, Lecoer S. 2010. The role of the placenta in fetal exposure to xenobiotics: importance of membrane transporters and human models for transfer studies. *Drug Metab Dispos* 38:1623-1635.
12. Ganapathy V. 2011. Drugs of abuse and human placenta. *Life Sci* 88:926-930.
13. Ni Z, Mao Q. 2011. ATP-binding cassette efflux transporters in human placenta. *Curr Pharm Biotechnol* 12:674-685.
14. Syme MR, Paxton JW, Keelan JA. 2004. Drug transfer and metabolism by the human placenta. *Clin Pharmacokinet* 43:487-514.
15. Pasanen M, Pelkonen O. 1994. The expression and environmental regulation of P450 enzymes in human placenta. *Crit Rev Toxicol* 24:211-229.
16. Berniske K, Kaufmann P. 2000. Early Development of the Human Placenta. In: Berniske K, Kaufmann P. eds, New-York, Springer-Verlag: p 40-9.
17. Eaton B, Contractor S. 1993. In vitro assessment of trophoblast receptors and placental transport mechanisms. In: Redman CW, Sargent IL, Starkey PM. eds The human placenta London: Blackwell Scientific Publication 471-503.

18. Ogren L, Talamentes F. 1994. The placenta as an endocrine organ: polypeptides. In: Knobil E, Neill J. eds. *Physiology of reproduction*. New-York: Raven Press. 875-945.
19. Mori M, Ishikawa G, Luo SS, et al. 2007. The cytotrophoblast layer of human chorionic villi becomes thinner but maintains its structural integrity during gestation. *Biol Reprod* 76:164-172.
20. Malassine A, Frendo JL, Blaise S, et al. 2008. Human endogenous retrovirus-FRD envelope protein (syncytin 2) expression in normal and trisomy 21-affected placenta. *Retrovirology* 5:6.
21. King A, Thomas L, Bischof P. 2000. Cell culture models of trophoblast II: trophoblast cell lines--a workshop report. *Placenta* 21 Suppl A:S113-119.
22. Bilban M, Tauber S, Haslinger P, et al. 2010. Trophoblast invasion: assessment of cellular models using gene expression signatures. *Placenta* 31:989-996.
23. Atkinson DE, Greenwood SL, Sibley CP, Glazier JD, Fairbairn LJ. 2003. Role of MDR1 and MRP1 in trophoblast cells, elucidated using retroviral gene transfer. *Am J Physiol Cell Physiol* 285:C584-591.
24. Kliman HJ, Nestler JE, Sermasi E, Sanger JM, Strauss JF, 3rd. 1986. Purification, characterization, and in vitro differentiation of cytotrophoblasts from human term placentae. *Endocrinology* 118:1567-1582.
25. Frendo JL, Cronier L, Bertin G, et al. 2003. Involvement of connexin 43 in human trophoblast cell fusion and differentiation. *J Cell Sci* 116:3413-3421.
26. Frendo JL, Olivier D, Cheynet V, et al. 2003. Direct involvement of HERV-W Env glycoprotein in human trophoblast cell fusion and differentiation. *Mol Cell Biol* 23:3566-3574.
27. Tarrade A, Lai Kuen R, Malassine A, et al. 2001. Characterization of human villous and extravillous trophoblasts isolated from first trimester placenta. *Lab Invest* 81:1199-1211.
28. Handschuh K, Guibourdenche J, Tsatsaris V, et al. 2007. Human chorionic gonadotropin expression in human trophoblasts from early placenta: comparative study between villous and extravillous trophoblastic cells. *Placenta* 28:175-184.
29. Cocquebert M, Berndt S, Segond N, et al. 2012. Comparative expression of hCG beta-genes in human trophoblast from early and late first-trimester placentas. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 303:E950-958.
30. Frendo JL, Therond P, Bird T, et al. 2001. Overexpression of copper zinc superoxide dismutase impairs human trophoblast cell fusion and differentiation. *Endocrinology* 142:3638-3648.
31. Alsat E, Haziza J, Evain-Brion D. 1993. Increase in epidermal growth factor receptor and its messenger ribonucleic acid levels with differentiation of human trophoblast cells in culture. *J Cell Physiol* 154:122-128.
32. Alsat E, Wyplosz P, Malassine A, et al. 1996. Hypoxia impairs cell fusion and differentiation process in human cytotrophoblast, in vitro. *J Cell Physiol* 168:346-353.
33. Frendo JL, Therond P, Guibourdenche J, Bidart JM, Vidaud M, Evain-Brion D. 2000. Modulation of copper/zinc superoxide dismutase expression and

- activity with in vitro differentiation of human villous cytotrophoblasts. *Placenta* 21:773-781.
34. Serrano MA, Macias RI, Briz O, et al. 2007. Expression in human trophoblast and choriocarcinoma cell lines, BeWo, Jeg-3 and JAr of genes involved in the hepatobiliary-like excretory function of the placenta. *Placenta* 28:107-117.
35. Alsat E, Mirlesse V, Fondacci C, Dodeur M, Evain-Brion D. 1991. Parathyroid hormone increases epidermal growth factor receptors in cultured human trophoblastic cells from early and term placenta. *J Clin Endocrinol Metab* 73:288-295.
36. Pidoux G, Gerbaud P, Gnidehou S, et al. 2010. ZO-1 is involved in trophoblastic cell differentiation in human placenta. *Am J Physiol Cell Physiol* 298:C1517-1526.
37. Gerbaud P, Pidoux G, Guibourdenche J, et al. 2011. Mesenchymal activin-A overcomes defective human trisomy 21 trophoblast fusion. *Endocrinology* 152:5017-5028.
38. Evseenko DA, Paxton JW, Keelan JA. 2006. ABC drug transporter expression and functional activity in trophoblast-like cell lines and differentiating primary trophoblast. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 290:R1357-1365.
39. Yeboah D, Sun M, Kingdom J, et al. 2006. Expression of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in human placenta throughout gestation and at term before and after labor. *Can J Physiol Pharmacol* 84:1251-1258.
40. Nakamura Y, Ikeda S, Furukawa T, et al. 1997. Function of P-glycoprotein expressed in placenta and mole. *Biochem Biophys Res Commun* 235:849-853.
41. Sun M, Kingdom J, Baczyk D, Lye SJ, Matthews SG, Gibb W. 2006. Expression of the multidrug resistance P-glycoprotein, (ABCB1 glycoprotein) in the human placenta decreases with advancing gestation. *Placenta* 27:602-609.
42. Akiyama M. 2011. The roles of ABCA12 in keratinocyte differentiation and lipid barrier formation in the epidermis. *Dermatoendocrinol* 3:107-112.
43. Nishimura M, Naito S. 2005. Tissue-specific mRNA expression profiles of human ATP-binding cassette and solute carrier transporter superfamilies. *Drug Metab Pharmacokinet* 20:452-477.
44. Paytubi S, Morrice NA, Boudeau J, Proud CG. 2008. The N-terminal region of ABC50 interacts with eukaryotic initiation factor eIF2 and is a target for regulatory phosphorylation by CK2. *Biochem J* 409:223-231.
45. Yu Y, Zhang Y, Zhu Z, Berger SA. 2011. ABC50 modulates sensitivity of HL60 leukemic cells to endoplasmic reticulum (ER) stress-induced cell death. *Biochem Pharmacol* 81:488-497.
46. Yung HW, Hemberger M, Watson ED, et al. 2012. Endoplasmic reticulum stress disrupts placental morphogenesis: implications for human intrauterine growth restriction. *The Journal of pathology* doi: 10.1002/path.4068.

47. Dutta B, Huang W, Molero M, et al. 1999. Cloning of the human thiamine transporter, a member of the folate transporter family. *J Biol Chem* 274:31925-31929.
48. Ugele B, St-Pierre MV, Pihusch M, Bahn A, Hantschmann P. 2003. Characterization and identification of steroid sulfate transporters of human placenta. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 284:E390-398.
49. Ugele B, Bahn A, Rex-Haffner M. 2008. Functional differences in steroid sulfate uptake of organic anion transporter 4 (OAT4) and organic anion transporting polypeptide 2B1 (OATP2B1) in human placenta. *J Steroid Biochem Mol Biol* 111:1-6.
50. Kalliokoski A, Niemi M. 2009. Impact of OATP transporters on pharmacokinetics. *Br J Pharmacol* 158:693-705.
51. Busch J, Frank V, Bachmann N, et al. 2012. Mutations in the prostaglandin transporter *SLCO2A1* cause primary hypertrophic osteoarthropathy with digital clubbing. *J Invest Dermatol* 132:2473-2476.
52. Jauniaux E, Watson AL, Hempstock J, Bao YP, Skepper JN, Burton GJ. 2000. Onset of maternal arterial blood flow and placental oxidative stress. A possible factor in human early pregnancy failure. *Am J Pathol* 157:2111-2122.
53. Haddow JE, Palomaki GE, Allan WC, et al. 1999. Maternal thyroid deficiency during pregnancy and subsequent neuropsychological development of the child. *N Engl J Med* 341:549-555.
54. Glinoer D. 1997. The regulation of thyroid function in pregnancy: pathways of endocrine adaptation from physiology to pathology. *Endocr Rev* 18:404-433.
55. Friesema EC, Ganguly S, Abdalla A, Manning Fox JE, Halestrap AP, Visser TJ. 2003. Identification of monocarboxylate transporter 8 as a specific thyroid hormone transporter. *J Biol Chem* 278:40128-40135.
56. Visser WE, Friesema EC, Visser TJ. 2011. Minireview: thyroid hormone transporters: the knowns and the unknowns. *Mol Endocrinol* 25:1-14.
57. Bidart JM, Lacroix L, Evain-Brion D, et al. 2000. Expression of Na⁺/I⁻ symporter and Pendred syndrome genes in trophoblast cells. *J Clin Endocrinol Metab* 85:4367-4372.
58. Degrelle SA, Guibourdenche J, Galland F, Bidart JM, Fournier T, Evain-Brion D. 2013. Iodide transporters expression in early human invasive trophoblast. *Placenta* 34:29-34.
59. Kobayashi T, Beuchat MH, Lindsay M, et al. 1999. Late endosomal membranes rich in lysobisphosphatidic acid regulate cholesterol transport. *Nat Cell Biol* 1:113-118.
60. Verhaagh S, Schweifer N, Barlow DP, Zwart R. 1999. Cloning of the mouse and human solute carrier 22a3 (*Slc22a3/SLC22A3*) identifies a conserved cluster of three organic cation transporters on mouse chromosome 17 and human 6q26-q27. *Genomics* 55:209-218.
61. Ahmadimoghaddam D, Zemankova L, Nachtigal P, et al. 2013. Organic cation transporter 3 (*OCT3/SLC22A3*) and multidrug and toxin extrusion 1 (*MATE1/SLC47A1*) transporter in the placenta and fetal tissues: expression profile and fetus protective role at different stages of gestation. *Biol Reprod* 88:55.

Fig. 1. In vitro model of human cytotrophoblast differentiation.

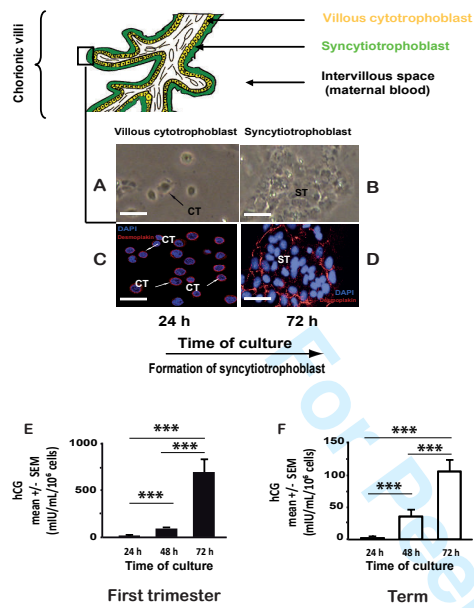


Fig. 2. ABCB1/P-gp and ABCG2/BCRP drug transporters protein expression in first-trimester trophoblast cells cultured for 72 hours to form a syncytiotrophoblast.

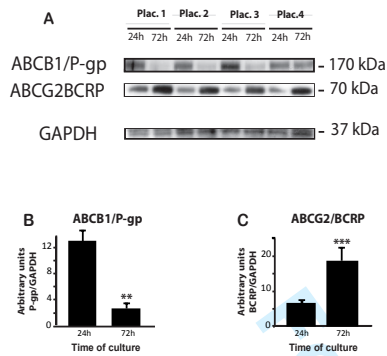


Fig. 3. ABCB1/P-gp and ABCG2/BCRP drug transporters protein expression in third-trimester placenta trophoblast cells cultured for 72 hours to form a syncytiotrophoblast

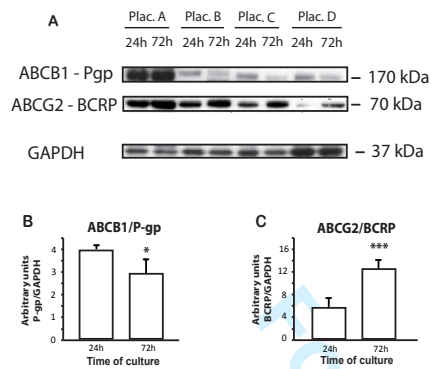


Fig .4. Immunohistochemistry - Localization of ABCB1 and BCRP during the first trimester of pregnancy.

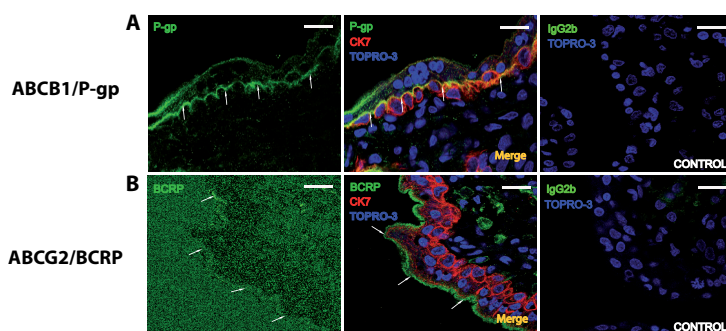


Table 1 – Trophoblast expression of ABC transporters during the first- and the third trimesters of pregnancy.

Drug transporter/alias (gene)	Substrates	First-trimester placentas		Third-trimester placentas	
		CT	ST	CT	ST
ABC1/TGD (ABCA1)	Cholesterol, phospholipids	■ ■ ■	■ ■ ■	■ ■ ■	■ ■ ■
ABC2 (ABCA2)	Low-density Lipoprotein (LDL), sterols	■	■	■	■
ABC3/ABC-C (ABCA3)	Phosphatidylcholine, phosphatidylglycerol	■	■	□	■
ABCR/ RMP (ABCA4)	All-trans-retinal aldehyde (retinylidene-phosphatidylethanolamine)	■ ■	■ ■	■ ■	■ ■
EST640918 (ABCA9)	Unknown	■	■	■ ■	■ ■
LI2/ICR2B (ABCA12)	Glucosylceramide	■ ■ ■	■ ■ ■	■ ■ ■	■ ■ ■
FLJ16398/ DKFZp313D2411 (ABCA13)	Unknown	■	■	-	□
P-gp /MDR1 (ABCB1)	Paclitaxel, docetaxel, doxorubicin, epirubicin, etoposide, vinblastine, vincristine, irinotecan, verapamil, diltiazem, erythromycin, cyclosporine, cimetidine, loperamide	■ ■ ■	■ ■ ■	■ ■ ■	■ ■ ■
TAP1 (ABCB2)	Peptides	■ ■	■ ■	■ ■	■ ■
TAP2 (ABCB3)	Peptides	■ ■ ■	■ ■ ■	■ ■ ■	■ ■ ■
MDR3/PGY3 (ABCB4)	Paclitaxel, vinblastine, digoxin, verapamil	■ ■	■	■ ■	■ ■
PRP/ABCI4 (ABCB6)	Heme, protoporphyrins	■ ■ ■	■ ■ ■	■ ■ ■	■ ■ ■
BSEP/SPGP (ABCB11)	Pravastatin, bile acids	□	-	-	-
MRP1/ABCC (ABCC1)	Methotrexate, cyclophosphamide, paclitaxel, daunorubicin, doxorubicin, vinblastine, vincristine, irinotecan, melphalan, chlorambucil	■ ■ ■	■ ■ ■	■ ■ ■	■ ■ ■
MRP2/DJS (ABCC2)	Methotrexate, doxorubicin, cisplatin, irinotecan, mitoxantrone, etoposide, vinblastine, vincristine	■ ■ ■	■ ■	■ ■ ■	■ ■ ■

MRP3/MLP2 (ABCC3)	Methotrexate, vincristine, etoposide, bile salts (cholate, taurocholate, glycocholate), glutathione	■	■	■	■
MRP4/MOATB (ABCC4)	Methotrexate, topotecan, irinotecan, adefovir, tenofovir, furosemide, cyclic AMP, cyclic GMP, bile acids	■	■	■	■
MRP5/SMRP (ABCC5)	6-mercaptopurine, cyclic nucleotid analogs, pemetrexed, gemcitabine, 5-fluorouracil, cytosine arabinoside, methotrexate	■	■	■	■
MRP6/ARA (ABCC6)	6-mercaptopurine, glutathione S-conjugates, leukotriene C4, S-glutathione, cyclopentapeptide BQ123	■	■	□	□
MRP7/SIMRP7 (ABCC10)	Docetaxel, paclitaxel, estradiol-17-β, leukotriene C4	■	■	■	■
MRP8 (ABCC11)	Cyclic nucleotide (cAMP, cGMP), folic acid, oestradiol-17-β, taurocholate, glycocholate, leukotriene C4	□	■	■	■
ALD/ALDP (ABCD1)	Very long chain fatty acids	■	■	■	■
ABC43/PMP70 (ABCD3)	Long chain acyl-CoAs	■	■	■	■
P70R/PMP69 (ABCD4)	Unknown	■	■	■	■
ABC27/ABC50 (ABCF1)	Unknown	■	■	■	■
BCRP/MXR (ABCG2)	Methotrexate, mitoxantrone, irinotecan, topotecan, imatinib, doxorubicin, epirubicin, etoposide, ofloxacin, lamivudine, pravastatin, prazosin, nitrofurantoin, cimetidine, topotecan	■	■	■	■
(ABCG8)	Cholesterol and other neutral sterols	■	□	■	■

Abbreviations: Ct: cycle threshold; CT: cytotrophoblasts; ST: syncytiotrophoblasts.

□ : Below the limit of quantification (Ct>34)

□ : Very low expression or limit of quantification (Ct= [32-34])

■ : Low expression (Ct= [30-32])

■ : Intermediate expression (Ct= [27-30])

■ : High expression (Ct= [22-27])

■ : Very high expression (Ct < 22)

Table 2 – Evolution of semi-quantitative trophoblast expression of SLC transporters (mRNA) during the first- and third-trimesters of pregnancy.

Drug transporters/alias (gene)	Substrates	First-trimester placentas		Third-trimester placentas	
		CT	ST	CT	ST
GLUT1 (SLC2A1)	Glucose, galactose, mannose, glucosamine	■■■■	■■■■	■■■■	■■■■
GLUT2 (SLC2A2)	Glucose, fructose, galactose, mannose	■	□	■	■
GLUT3 (SLC2A3)	Glucose, 2-deoxy-D-glucose, mannose, galactose, maltose, xylose	■■■	■■■	■■■	■■■
D2H/ATRI (SLC3A1)	L-arginine, L-cystine, L-leucine	■■■	■■■	■■■	■■■
4F2/CD98 (SLC3A2)	Valine, leucine, isoleucine, tryptophane, tyrosine	■■■■	■■■■	■■■■	■■■■
NAGT/SGLT1 (SLC5A1)	Glucose, galactose	□	-	-	-
LAT1/E16 (SLC7A5)	L-dopa, thyroid hormones, melphalan, baclofene, gabapentine, alpha-methyl-dopa	■■■■	■■■■	■■■■	■■■■
LAT-2/y ⁺ LAT-2 (SLC7A6)	L-leucine, L-arginine, glutamine	■■■	■■■	■■■	■■■
y ⁺ LAT-2/LPI (SLC7A7)	L-leucine, L-arginine, thyroid hormones	■■■	■■■	■■■	■■■
LAT2/LPI-PC1 (SLC7A8)	Phenylalanine, tyrosine, leucine, arginine and tryptophan, L-dopa, thyroid hormones, melphalan, baclofene, gabapentine, alpha-methyl-dopa	■■■■	■■■	■■■	■■■
CSNU3 (SLC7A9)	Arginine, ornithine, alanine, leucine or isoleucine	■	■	■	■
xCT/CCBRI (SLC7A11)	Cystine, glutamate	■■■	■■■	■■■	■■■
NTCP/NTCP1 (SLC10A1)	Na ⁺ /taurocholate-cotransporting polypeptide	■■	■■	■■	■■
SOAT (SLC10A6)	Sulfoconjugated steroid hormones, taurothiocholic acid-3-sulfate and sulfoconjugated pyrenes, sulfoconjugated bile acid	■■	■■	■■	■■
PEPT1/HPEC(SLC15A1)	Oseltamivir, valaciclovir, amoxicilline, cephalixin	■	■	□	□
PEPT2/ FLJ33407 (SLC15A2)	Amino-beta-lactam antibiotics amoxicillin (cephalosporin/penicillin), angiotensin-converting enzyme inhibitors (captopril, enalapril, fosinopril)	■■	■■	■■■	■■
MCT1 (SLC16A1)	Lactate, pyruvate, ketone bodies acetoacetate	■■■	■■■	■■■	■■■
MCT8 (SLC16A2)	Thyroid hormones (T3, T4, rT3, T2)	■■■	■■■	■■■	■■■

John Wiley & Sons, Inc.

MCT3/MCT4 (SLC16A3)	Lactate, pyruvate, lovastatin acid	■	■	■	■
RFC1 (SLC19A1)	N ₅ -Methyltetrahydrofolate	■	■	■	■
TRMA/TH1T (SLC19A2)	Thiamine	■	■	■	■
THTR2 (SLC19A3)	Thiamine	■	■	■	■
OCT1/hOCT1 (SLC22A1)	Metformin, aciclovir, ganciclovir, desipramine, serotonin, prostaglandin E2	■	■	■	■
hOCT3/hEMT (SLC22A3)	Guanidine, dopamine, norepinephrine, histamine	■	■	-	-
OCTN1 (SLC22A4)	Verapamil, quinidine, ipratropium	■	■	■	■
OCTN2/CDSP (SLC22A5)	Ipratropium, quinidine, verapamil, carnitine	■	■	■	■
OAT1/PAHT (SLC22A6)	Dicarboxylic acid, para-aminohippurate (PAH), cyclic nucleotides, antibiotics, antiviral agents antineoplastic agents, raltegravir	-	□	-	-
NLT/OAT2 (SLC22A7)	5-fluorouracil, paclitaxel, prostaglandin, tetracycline, zidovudine	□	-	-	-
OAT7 (SLC22A9)	Unknown	□	□	□	□
hOAT4 (SLC22A11)	Tetracycline, zidovudine, bumetanide, pravastatin, methotrexate, prostaglandin and estrone	■	■	■	■
(SLC25A13)	Aspartate, glutamate	■	■	■	■
CNT1/HCNT1 (SLC28A1)	Pyrimidine nucleosides, ribavirin, zidovudine	-	□	-	□
CNT2/HCNT2 (SLC28A2)	Nucleosides, didanosine and ribavirin, purine and pyrimidine nucleoside analogs	■	■	■	■
CNT3/HCNT3 (SLC28A3)	Nucleosides, gemcitabine, cladribine, 5-fluorouracil, fludarabine, zebularine	■	■	■	■
ENT1 (SLC29A1)	Nucleosides, cytarabine, gemcitabine, fludarabine	■	■	■	■
ENT2/DER12 (SLC29A2)	Antiretrovirals (2'3'-dideoxyinosine) (ddI), AZT, ddC	■	■	■	■
CTR1 (SLC31A1)	Copper, cisplatin	■	■	■	■
ATA2/ SNAT2 (SLC38A2)	Glutamine, alanine, serine, proline, histidine, glycine, asparagine, cysteine	■	■	■	■
SN2/JM24 (SLC38A5)	Serine, alanine, glycine, glutamine, asparagine, histidine	■	■	□	■
OATPIA2 (SLC01A2)	Thyroxine, methotrexate, imatinib, saquinavir, levofloxacin	□	□	■	■

John Wiley & Sons, Inc.

OATP2A1 (SLCO2A1)	Prostaglandin	■■■	■■■	■■■	■■■
OATP3A1 (SLCO3A1)	Unknown	■■	■■	■■	■■
OATP4A1 (SLCO4A1)	Thyroid hormones, steroid conjugates, PGE2, benzylpenicillin, bile salts	■■■	■■■	■■■	■■■
OATP2B1 (SLCO2B1)	Benzylpenicillin, digoxin, pravastatin, rosuvastatin, fexofenadine, enalapril, dehydroepiandrosterone	■■	■■	■■	■■■

Abbreviations: Ct: cycle threshold; CT: cytotrophoblasts; ST: syncytiotrophoblasts.

□ : Below the limit of quantification (Ct>34)

□ : Very low expression or limit of quantification (Ct= [32-34])

■ : Low expression (Ct= [30-32])

■■ : Intermediate expression (Ct= [27-30])

■■■ : High expression (Ct= [22-27])

■■■■ : Very high expression (Ct < 22)

Table 3. Non-expressed ABC- and SLC-transporters during the first- and the third- trimesters of pregnancy.

Drug transporter/alias (gene)	Substrates
(ABCB5)	Doxorubicin
MRP9 (ABCC12)	<i>Unknown</i>
SAAT1/SGLT3 (SLC5A4)	Imino sugars
OAT1/HOAT1 (SLC22A6)	Amoxicilin, tetracyclin, acyclovir, methotrexate, prostaglandin E2, ibuprofen
OAT3 (SLC22A8)	Methotrexate, cortisol, pravastatin, prostaglandin, tetracycline, zidovudine
CNT1/HCNT1 (SLC28A1)	Nucleosides, gemcitabine, 5' deoxy- 5-fluorouracil, 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT), 2',3'-dideoxycytidine
OATP1B1 (SLCO1B1)	Bile acids, conjugated steroids, thyroid hormones, peptides, rifampicin, pravastatin

Table 4 : Significant differences in up/down-regulated genes between CT and ST in first-trimester and term placentas.

Gene symbol	Average fold regulation in ST vs. CT isolated from first-trimester placentas	Average fold regulation in ST vs. CT isolated from term placentas	Average fold regulation in CT isolated from term placentas vs. CT from first-trimester placentas	Average fold regulation in ST isolated from term placentas vs. ST from first-trimester placentas
ABCA1		2.12**		
ABCA2		2.23**		
ABCA3	3.42***	6.17***	-2.51**	
ABCA9			2.33**	2.93***
ABCA12			2.16***	3.09***
ABCA13				-2.5*
ABCB1		3.2*		
ABCB4	-2.09***			
ABCC2				2.89***
ABCC3	2.11***	2.40*		
ABCC4			-2.39*	
ABCC5		2.34***		2.15***
ABCC10				2.14***
ABCC11		2.41**		
ABCD4		2.11***		2.26***
ABCG8	-2.13*		-2.09***	
AQP1			-3.28*	-4.55***
AQP9			2.38**	4.32**
ATP7A		2.05**		2.44*
SLC2A2				2.39**
SLC2A3	2.15**	3.40***	-7.81***	-4.93***
SLC3A1				2.27***
SLC5A4				2.79*
SLC7A5	-2.63***	-4.39***	-2.89***	-4.83***
SLC7A7	2.81***	6.72***	3.63**	5.34***
SLC7A8		2.34**	-2.89**	
SLC15A1			-3.55*	-14.81*
SLC15A2	-5.46***			5.34***
SLC16A2	-4.25***	-5.18***		-3.47***
SLC16A3			-3.69**	
SLC19A2				2.12***
SLC19A3				2.50**
SLC22A3			-10.01**	-7.95**
SLC22A9		2.66**		
SLC28A3				2.03*
SLC38A5			-10.86**	-7.80**
SLCO2A1	5.94***	12.69***	-3.56*	-2.21**
SLCO2B1	2.72***	7.48**		3.57**
SLCO4A1		3.17**	-3.68***	

Article 2

Etude comparative du passage transplacentaire des taxanes avec utilisation du modèle de cotylédon placentaire perfusé

Comme nous l'avons introduit plus haut, très peu de données concernant le passage transplacentaire des chimiothérapies sont disponibles, notamment celles concernant les taxanes. Pourtant, ces molécules sont de plus en plus utilisées dans le cancer du sein et notamment chez la femme enceinte. Or, il n'existe pas de données de passage transplacentaire du docétaxel et seulement une étude s'est intéressée au passage transplacentaire du paclitaxel. Les praticiens n'ont donc à ce jour aucun rationnel pour opter pour l'une ou l'autre de ces molécules lorsqu'il s'agit de traiter une patiente enceinte atteinte d'un cancer du sein.

Le but de notre étude était d'apporter pour la première fois des données de passage transplacentaire comparatives, du paclitaxel et du docétaxel, en utilisant le modèle du cotylédon placentaire perfusé, qui est à ce jour le modèle *ex vivo* de référence afin d'étudier le passage transplacentaire des médicaments.

Pour ce faire, nous avons utilisé des placentas issus de grossesses menées à terme, que nous avons perfusés selon la technique dérivée de Schneider et al. (Schneider, Panigel, and Dancis 1972). Nous avons aussi fait varier le paramètre de la concentration en albumine du perfusât maternel afin d'évaluer si celle-ci avait un rôle sur le passage transplacentaire des taxanes. Enfin, nous avons évalué l'accumulation cotylédonaire à chaque fin de perfusion afin de mettre en évidence une éventuelle corrélation entre passage transplacentaire et accumulation placentaire.

Nous avons mis en évidence que les passages transplacentaires du paclitaxel et du docétaxel n'étaient pas statistiquement différents, aussi bien en termes de taux de transfert fœtal et d'indices de clearance, mais aussi en terme d'accumulation cotylédonaire. Concernant l'impact de la concentration en albumine, de manière

intéressante, plus celle-ci était basse, plus le passage transplacentaire était important.

Ces données originales fournissent donc un rationnel minimum pour l'utilisation des deux molécules de taxanes disponibles sur le marché, et rassurent quant à leur passage transplacentaire. Ces données issues d'un modèle *ex vivo*, viennent corroborer les résultats plutôt encourageants et rassurants issus des revues cliniques de la littérature disponibles à ce jour.

**Cette étude a été publiée dans l'*American Journal of Obstetrics and Gynecology*,
2012, 207(6):514:e1-7.**

BASIC SCIENCE: OBSTETRICS

Comparative transplacental transfer of taxanes using the human perfused cotyledon placental model

Paul Berveiller, MD; Cécile Vinot, MSc; Olivier Mir, MD; Sophie Broutin, PhD, PharmD; Alain Deroussent, MSc; Atmane Seck, MSc; Sandra Camps, PharmD; Angelo Paci, PhD, PharmD; Sophie Gil, PhD; Jean-Marc Tréluyer, MD, PhD

OBJECTIVES: The use of taxanes (paclitaxel and docetaxel) in pregnant cancer patients is increasing. We aimed to compare their transplacental transfer using the gold standard human placental perfusion model, to guide drug selection.

STUDY DESIGN: Term placentas were perfused with paclitaxel or docetaxel and 2 different albumin concentrations. Main transfer parameters such as fetal transfer rate (FTR), clearance index, and placental uptake of taxanes were assessed.

RESULTS: Twelve placentas were perfused, 6 with paclitaxel and 6 with docetaxel. Mean FTR of paclitaxel decreased significantly from $5.67 \pm 0.02\%$ in low albumin conditions to $1.72 \pm 0.09\%$ in physiological albumin conditions. Similarly, mean clearance index decreased signifi-

cantly from 0.22 ± 0.02 to 0.09 ± 0.01 . Regarding docetaxel, mean FTR were similar in low albumin and physiological conditions ($5.03 \pm 0.60\%$ and $4.04 \pm 0.22\%$, respectively) while mean clearance index decreased significantly from 0.18 ± 0.02 to 0.13 ± 0.01 . Taxanes accumulation in cotyledon was similar for docetaxel and paclitaxel: $4.54 \pm 1.84\%$ vs $3.31 \pm 1.88\%$, respectively.

CONCLUSION: Transplacental transfer and placental accumulation of paclitaxel and docetaxel were low and similar, especially in physiological conditions of albumin. Further studies are warranted to optimize the selection of a taxane in pregnant cancer patients.

Key words: cancer, docetaxel, paclitaxel, placenta, pregnancy, taxanes

Cite this article as: Berveiller P, Vinot C, Mir O, et al. Comparative transplacental transfer of taxanes using the human perfused cotyledon placental model. *Am J Obstet Gynecol* 2012;207:514.e1-7.

Cancer is the second leading cause of mortality in young women aged 25-44 years in Western countries.¹ About 1/1000 to 1/2000 pregnant patients are diagnosed with a malignancy, breast and gynecological cancers being

the most common.² This incidence is expected to increase, given the trend for women to delay childbearing.

Chemotherapy may be indicated in pregnant patients, with the need to balance both the maternal and fetal prognoses.

Parameters that should be taken into account include gestational age, cancer stage and aggressiveness, patients' wishes, and potential toxicities of active anticancer treatments.²⁻⁴

Chemotherapy is contraindicated during organogenesis since its use increases the rates of miscarriages, intrauterine death, and malformations.²⁻⁴ However, during the second and third trimesters of pregnancy, several drugs such as doxorubicin and epirubicin may be used with limited short-term toxicity.^{5,6} Of note, the transplacental transfer of doxorubicin and epirubicin averages 3-4%.^{7,8}

Conversely, other agents such as the humanized IgG1 trastuzumab may induce significant fetal toxicity, probably consecutive to a large transplacental transfer.^{4,9,10}

Among active drugs in breast, gynecological, and lung neoplasms that may occur during pregnancy, taxanes display a favorable toxicity profile during the second and third trimesters.¹¹ Indeed, paclitaxel and docetaxel are inhibitors of the depolymerization of microtubules, and target the beta-tubulin. Taxanes subsequently induce the formation of deformed tubulin structure that finally in-

From the Department of Clinical Pharmacology and Clinical Research Unit, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale Centre d'Investigations Cliniques P 0901, Cochin Teaching Hospital, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (Drs Berveiller and Tréluyer, and Ms Vinot), and Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale Unit 767-PremUp Foundation (Drs Berveiller and Gil), Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France; French Network Cancers Associés à La Grossesse, Paris (Drs Berveiller, Mir, and Tréluyer); Department of Medical Oncology (Dr Mir), Department of Pharmacology and Drug Analysis (Drs Broutin and Paci, and Mr Seck), and Centre National de la Recherche Scientifique Research Unit 8203, Université Paris-Sud (Mr Deroussent, Mr Seck, and Dr Paci), Institut Gustave Roussy, Villejuif, France; and Department of Pharmacy, Institut Mutualiste Montsouris, Paris, France (Dr Camps).

Received April 16, 2012; revised Sept. 14, 2012; accepted Oct. 3, 2012.

The last 2 authors contributed equally to this article.

O.M. has acted as paid consultant for Roche, Servier, and Pfizer. No other author reports a conflict of interest.

Supported by a study grant from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale and the Association pour la Recherche contre le Cancer.

Preliminary data from this study were presented at the Physiology, Pharmacology, and Therapeutics Meeting in Grenoble, France, March 22-24, 2011.

Reprints: Paul Berveiller, MD, PhD, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale Unité Mixte de Recherches-S 767-PremUp Foundation, Pharmaceutical and Biological Sciences Faculty-Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité-4, Avenue de l'Observatoire, F75006 Paris, France. paul.berveiller@inserm.fr.

0002-9378/\$36.00 • © 2012 Mosby, Inc. All rights reserved. • <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajog.2012.10.007>

duces apoptosis.¹² Maternal side effects (mainly alopecia, nausea and vomiting, hematological toxicity) seem to be mild and manageable, as seen in nonpregnant women.¹¹ To date, fetal side effects are scarcely documented, mainly represented by intrauterine growth restriction, anhydramnios, and cytopenia. This toxicity profile seems to be nevertheless acceptable, for both drugs.^{11,13}

However, no data are available regarding the comparative use of paclitaxel and docetaxel in pregnant patients. Although a low transplacental transfer rate was previously suggested for paclitaxel,^{14,15} nothing is known about docetaxel.

Given the lack of objective data that may guide the selection of a taxane for the treatment of pregnant patients, we aimed to comparatively assess the transplacental transfer of paclitaxel and docetaxel in different albumin conditions, using the ex vivo gold standard method of human perfused cotyledon,¹⁶ and therefore, to determine the placental accumulation of taxanes.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Term placentas (37-41 weeks+5 days of gestation) from uneventful pregnancies were immediately collected (n = 12) after vaginal delivery or cesarean section.

The enrolled patients did not receive any medication except for epidural analgesia or oxytocin during labor, and did not present any vascular disease such as diabetes mellitus, preeclampsia, or intrauterine growth restriction.

Each patient gave informed written consent. The study was approved by the local ethics committee.

The maternal and fetal solutions were prepared with Earle medium containing 2 or 30 g/L of bovine serum albumin (Euro-medex, Souffelweyersheim, France). Paclitaxel (Taxol; Bristol-Myers-Squibb, Rueil-Malmaison, France) and docetaxel (Taxotere; Sanofi-Aventis, Paris, France) were provided by the Department of Pharmacy of the Cochin Teaching Hospital in an injectable form (syringe). The targeted maternal concentrations of paclitaxel and docetaxel were around the average placental maximal concentration, ie, 1530 and

4150 ng/mL for an infusion of 90 mg/m² of paclitaxel¹⁷ and for an infusion of 100 mg/m² of docetaxel,¹⁸ respectively.

Methods

Placental perfusion

Collected placentas after cesarean section or vaginal delivery were subsequently perfused in an open, double circuit, according to a validated method.^{16,19} Perfusion experiments were started within 45 minutes after delivery.

After a visual examination to confirm vascular integrity of both maternal and fetal sides, a distal branch of a fetal artery and its associated vein that were supplying a peripheral cotyledon were cannulated. The fetal circulation was established at a flow rate of 6 mL/min with a peristaltic pump. After confirmation of absence of vascular leakage, the perfused area progressively whitened, which allowed visualization of the selected cotyledon.

The perfusion was initiated by inserting 2 catheters into the intervillous space on the maternal side. The maternal circulation was established at a flow rate of 12 mL/min with another peristaltic pump. The pH of the maternal and fetal reservoirs was adjusted to 7.4 and 7.2, respectively.

Parameters such as perfusion pressure in the fetal circuit and potential fluid leakage from the fetal or the maternal circulation are usually monitored to check the validity of the technique.

Hence, the balance of flows in the fetal circuit was controlled all along the perfusion procedure by checking the fetal artery and the fetal venous pressures. Given the fact that fetal artery flow was known (induced by the peristaltic pump), if a difference of pressure was noticed between the fetal artery and the fetal vein, the balance of flows was subsequently found incorrect and the perfusion procedure was discontinued (presence of leakage). If the balance was correct (same fetal artery and venous pressures), the procedure was pursued. Similarly, maternal circuit was monitored using the same parameters.

Usually, the pressure values are between 40-60 mm Hg for the fetal circulation, and between 10-20 mm Hg for the maternal circulation.

A freely diffusing marker, antipyrine (Ap), was added in the maternal medium (final concentration: 20 mg/L), then, paclitaxel (or docetaxel) was subsequently added into the same compartment. The perfusion duration was 90 minutes given the fact that the aim of our study was to only investigate the kinetic of transplacental transfer of taxanes. Indeed, the goal of the perfusion was to reach the plateau of placental transfer and then to stop the perfusion. Thus, a 90-minute perfusion is usually sufficient to access this kinetic of transplacental transfer.

Samples from the maternal reservoir were subsequently collected at 0, 30, 60, and 90 minutes whereas samples from venous fetal circulation were collected every 5-90 minutes to assess paclitaxel and docetaxel concentrations.

Ap concentrations were measured by high-performance liquid chromatography using ultraviolet detection at 290 nm. The mobile phase was a mixture of 0.05 mol/L phosphate buffer (pH 3)/methanol/tetrahydrofuran (75/25/0.9, vol/vol/vol). Standard curves were prepared with Ap concentrations ranging from 50-20,000 µg/L. Both within-day and between-day accuracies and precision were <10%, and the lower quantification limit of Ap was 50 µg/L.

Two transport parameters were assessed during the study, and calculated as follows: fetal transfer rate (FTR) = $(C_f/C_m) \times 100$, where C_f is the venous fetal concentration of drug and C_m is the maternal concentration of the same drug. The result is given as a percentage: clearance index = $FTR(\text{drug})/FTR(\text{Ap})$, where $FTR(\text{drug})$ is the FTR of the studied drug and $FTR(\text{Ap})$ is the FTR of Ap.

Another parameter was assessed during our experiments: the placental uptake ratio, calculated as follows: $[\text{cotyledon taxane molecule quantity (g)}/\text{maternal taxane molecule quantity (g)}] \times 100$.

Otherwise, we determined our success rate of placental perfusion and explained the different causes of failure, as recommended by a recent consensus.²⁰

Study of placental accumulation—quantitative analysis of taxanes

At the end of taxane perfusion, the cotyledon was perfused with a cold phosphate-buffered saline solution during 10 minutes (washing solution) and subsequently frozen in liquid nitrogen. All the cotyledons were subsequently stored at -80°C until sample processing before taxane analysis.

Once the extraction was achieved, quantitative analysis of docetaxel and paclitaxel was done using reverse-phase high-performance liquid chromatography (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) coupled with tandem mass spectrometry (Quattro-LCZ triple quadrupole mass spectrometer, Waters, Milford, MA). Briefly, 0.1 mL of cabazitaxel (200 ng/mL), used as internal standard, was added to aliquots (0.2 mL) of standards, controls, and samples before liquid-liquid extraction with *tert*-butyl-methyl-ether (1 mL). After vortex mixing and centrifugation at 13,000 rpm for 1 minute, organic supernatant (~ 1 mL) was transferred and evaporated at 40°C using a SpeedVac concentrator (Thermo Scientific, Rockford, IL). Remnant was diluted in 0.1 mL of solvent analysis (acetonitrile/methanol/0.05% formic acid; 30/30/40, vol/vol/vol) then drawn in a glass microvolume vial, before liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry analysis of 10 μL aliquot. Analytes were detected in the positive electrospray ion mode using tandem mass spectrometry with selective reaction monitoring. Mass transitions

monitored were mass-to-charge ratio (m/z) 808.0 \rightarrow 225.7 for docetaxel and m/z 854.0 \rightarrow 285.7 for paclitaxel using collision energy of 15, 18, and 12 eV, respectively. Analytes were quantified using Masslynx software (Micromass, Manchester, United Kingdom). The method was linear in the 2.5–2500 ng/mL and 1.0–1000 ng/mL concentration range for docetaxel and paclitaxel, respectively. The lower limit of quantification was 0.8 ng/mL and 1.2 ng/mL for docetaxel and paclitaxel, respectively.

Data and statistical analysis

Descriptive statistics (mean \pm SEM and median [range]) were used to describe analytical data. To compare the transplacental transfer of paclitaxel and docetaxel with 2 different albumin conditions, 1-way analysis of variance was applied.

Finally, to study the correlation between transplacental transfer and placental accumulation, a Spearman test was applied.

RESULTS

The median age of patients at delivery was 33.6 years (range, 25–42). All deliveries occurred at term (ie, 37–41 weeks+5 days), with a median term of delivery of 39.6 weeks of gestation (range, 37.1–41.7). Median neonate heights and weights were 48.5 cm (range, 46–52) and 3380 g (range, 2620–3920), respectively. Four deliveries were performed by cesarean section, and the 8 remaining deliveries were vaginal.

Twelve placentas were successfully perfused during 90 minutes. Two pla-

centas were cannulated but important leaks led us to abort the procedure before isolating the cotyledon. One cotyledon was successfully perfused and isolated, but during the procedure, pressure monitoring was not correct and the procedure was subsequently stopped. Finally, 3 placentas were excluded at the final checkpoint, ie, during the validation with Ap (the FTR of Ap was not correct).

Transplacental Transfer of Ap

The total mean FTR of Ap was 29.3% in all experiments. Individual mean FTRs in 2 g/L of albumin solution were 23%, 27%, and 34% for placentas perfused with paclitaxel, and 32%, 37%, and 22% for placentas perfused with docetaxel, respectively.

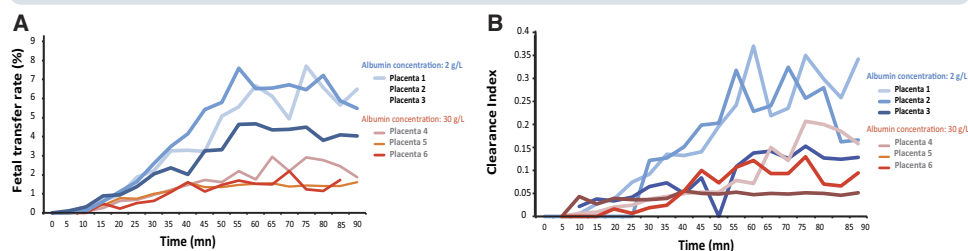
Individual mean FTRs in albumin physiological conditions (30 g/L of albumin solution) were 24%, 29%, and 21% for placentas perfused with paclitaxel, and 42%, 20%, and 40% for placentas perfused with docetaxel, respectively.

These results demonstrated the overlap between the maternal and the fetal circulation, and thereby led to a validation of each experiment.

Transplacental transfer of paclitaxel with 2 g/L and 30 g/L of albumin

Six placentas were perfused with paclitaxel, among them 3 placentas in 2 g/L albumin conditions and 3 placentas in 30 g/L albumin concentration. Mean maternal concentration of paclitaxel was similar as the targeted maximal concentration. All individual paclitaxel

FIGURE 1
Evolution of fetal transfer rate and clearance index of paclitaxel



A, Fetal transfer rate and B, clearance index of paclitaxel in physiological (30 g/L) and low albumin conditions during perfusion procedure.

Berveiller. Human ex vivo assessment of transplacental transfer and placental uptake of taxanes. *Am J Obstet Gynecol* 2012.

TABLE
Characteristics of paclitaxel and docetaxel transplacental transfer

Characteristic	Paclitaxel + low albumin	Paclitaxel + physiological conditions	Docetaxel + low albumin	Docetaxel + physiological conditions
Molecular weight, g/mol	854		807.9	
Plasmatic protein binding, %	89-98		>95	
Perfusion medium	Earle + albumin (2 g/L)	Earle + albumin (30 g/L)	Earle + albumin (2 g/L)	Earle + albumin (30 g/L)
Fetal transfer rate (%), mean \pm SEM	5.67 \pm 0.02	1.72 \pm 0.09	5.03 \pm 0.60	4.04 \pm 0.22
Clearance index, mean \pm SEM	0.22 \pm 0.02	0.09 \pm 0.01	0.18 \pm 0.02	0.13 \pm 0.01
Placental uptake (%), mean \pm SEM	—	3.31 \pm 1.88	—	4.54 \pm 1.84
No. of perfused placentas	3	3	3	3

Berveiller. Human ex vivo assessment of transplacental transfer and placental uptake of taxanes. Am J Obstet Gynecol 2012.

maternal concentrations were relatively stable during the experiment.

The kinetics of individual paclitaxel FTR during the perfusion procedure is represented in Figure 1, A. Mean FTR of paclitaxel decreased from 5.67 \pm 0.02% to 1.72 \pm 0.09% in low and physiological albumin conditions, respectively.

The kinetics of individual paclitaxel clearance index during the perfusion procedure is represented in Figure 1, B. Mean clearance index decreased from 0.22 \pm 0.02 to 0.09 \pm 0.01 in low and physiological conditions, respectively.

All the data regarding paclitaxel transplacental transfer are summarized in the Table.

Transplacental transfer of docetaxel with 2 g/L and 30 g/L of albumin

Six placentas were perfused with docetaxel, among them 3 placentas in 2 g/L

albumin conditions and 3 placentas in 30 g/L albumin concentration. Mean maternal concentration of docetaxel was similar as the targeted maximal concentration. All individual docetaxel maternal concentrations were relatively stable during the experiment.

The kinetics of docetaxel FTR during the perfusion procedure is represented in Figure 2, A. Mean FTR of docetaxel decreased from 5.03 \pm 0.60% to 4.04 \pm 0.22% in low and physiological albumin conditions, respectively.

The kinetics of individual docetaxel clearance index during the perfusion procedure is represented in Figure 2, B. Mean clearance index of docetaxel decreased from 0.18 \pm 0.02 to 0.13 \pm 0.01 in low and physiological albumin conditions, respectively.

All the data regarding docetaxel transplacental transfer are summarized in the Table.

Placental uptake of taxanes

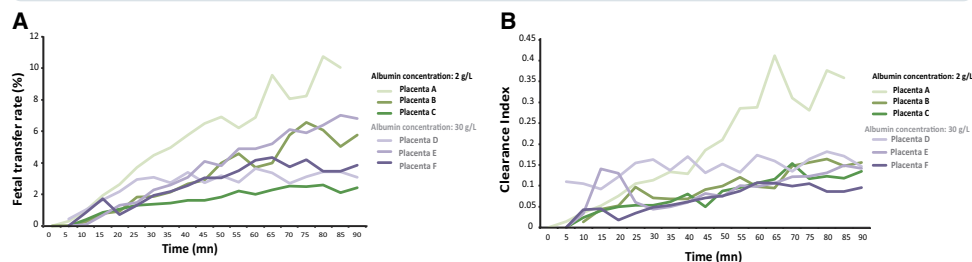
Three cotyledons perfused with paclitaxel in physiological conditions of albumin (30 g/L) were subsequently analyzed to access their placental uptake.

The mean mass of paclitaxel remaining in the cotyledon after the perfusion was found to be 30.5 \pm 15.41 μ g. Taking into account these results, we determined a mean placental uptake of paclitaxel of 3.31 \pm 1.88%.

Three others cotyledons perfused with docetaxel in physiological conditions of albumin (30 g/L) were subsequently analyzed to access their placental uptake.

The mean mass of docetaxel in the cotyledon was found to be 146.33 \pm 52.47

FIGURE 2
Evolution of fetal transfer rate and clearance index of docetaxel



A, Fetal transfer rate and B, clearance index of docetaxel in physiological (30 g/L) and low albumin conditions during perfusion procedure.

Berveiller. Human ex vivo assessment of transplacental transfer and placental uptake of taxanes. Am J Obstet Gynecol 2012.

μg . The mean placental uptake ratio of docetaxel was $4.54 \pm 1.84\%$.

The difference of placental uptake between paclitaxel and docetaxel in physiological conditions was not significant ($P = .67$). The Spearman correlation coefficients were 0.67 ($P = .18$) and 0.44 ($P = .4$) between placental accumulation and FTR and clearance index, respectively.

Comparative transplacental transfer of paclitaxel and docetaxel

The comparative mean values of paclitaxel and docetaxel FTR and clearance index are summarized in the Table. The difference of mean clearance index between the 2 taxanes was not significant in low and physiological albumin conditions ($P = .07$ and $P = .08$, respectively) (Figure 3).

However, there was a significant decrease of transplacental transfer of both taxanes in physiological conditions of albumin (30 g/L) vs low albumin conditions. Indeed, mean clearance index of paclitaxel was found to be reduced from 0.22 ± 0.02 to 0.09 ± 0.01 ($P = .001$). Similarly, mean clearance index of docetaxel decreased from 0.18 ± 0.02 to 0.13 ± 0.01 in physiological albumin conditions ($P = .018$).

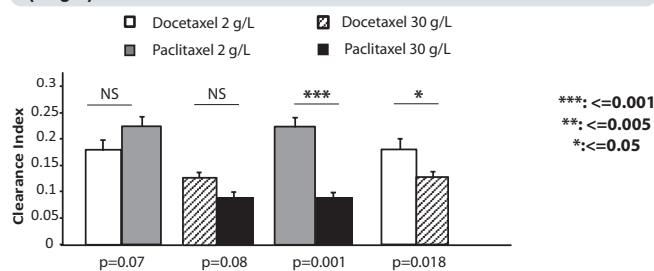
COMMENT

Taxanes represent attractive therapeutic options in pregnant cancer patients, due to their broad spectrum of activity in pregnancy-associated cancers, and their relatively low mutagenic potential compared to alkylating agents and topoisomerase II inhibitors.^{3,13} In the current study, we found that the transplacental transfer of paclitaxel and docetaxel were low, and similar.

In 6 perfused placentas, we found a relatively low transplacental transfer of paclitaxel, in line with the results of previous studies. Indeed, Nanovskaya et al¹⁵ evidenced a FTR of $3.97 \pm 1.76\%$ with a clearance index of 0.11 ± 0.02 , while we found a FTR of $5.67 \pm 0.02\%$ and a clearance index of 0.22 ± 0.02 in low albumin conditions, and a FTR of $1.72 \pm 0.09\%$ and a clearance index of 0.09 ± 0.01 in physiological albumin concentrations. However, these results should be interpreted carefully since an important vari-

FIGURE 3

Comparative mean clearance index of taxanes in physiological (30 g/L) and low albumin conditions



NS, not significant.

Berveiller. Human ex vivo assessment of transplacental transfer and placental uptake of taxanes. Am J Obstet Gynecol 2012.

ability was seen between cotyledons. Moreover, transplacental transfer profiles were different according to each perfused cotyledon with various profiles (eg, Figure 1, placentas 1 and 3).

These data suggest a large heterogeneity of placentas in our study, with different intrinsic cotyledon factors. An explanation for this variability could be in the differential expression of drug transporters, and in particular the P-glycoprotein (P-gp) (multidrug resistance protein 1 [MDR1], ATP binding cassette B1).²¹ Indeed, the P-gp plays a critical role in protecting the organism against xenobiotics, decreasing their tissular accumulation.²² P-gp expression was found to vary according to gestational age, but interpatient variability was also seen in pregnant women of similar gestational age.²³ Genetic polymorphisms in the *MDR1* gene encoding the P-gp could drive this variability, at least in part. Thus, a decreased P-gp activity (50%) was seen in a *MDR1* variant (3435T) Caucasian population.²⁴ In addition, in a Japanese population ($n = 13$), the expression of P-gp messenger RNA was found to be highly variable according to the C3435T allele status.²⁵

In 6 other placentas perfused with docetaxel, we found a low transplacental transfer, with a mean FTR of $5.03 \pm 0.60\%$, and a clearance index of 0.18 ± 0.02 in low albumin conditions, and a FTR of $4.04 \pm 0.22\%$ and a clearance index of 0.13 ± 0.01 in physiological albumin conditions.

min conditions. To our knowledge, these data are the first documentation of docetaxel transplacental transfer rates, using 2 different albumin concentrations. Maximal fetal concentrations were variable, as seen with paclitaxel. Transplacental transfer profiles were different according to the perfused cotyledon, with various profiles (Figure 2). Docetaxel is also a substrate for the P-gp, and *MDR1* polymorphisms may also partially explain these results.²⁶

In summary, our study evidenced that the transplacental transfer rates of paclitaxel and docetaxel were low and similar. These results were not surprising, because paclitaxel and docetaxel have a high molecular weight and are highly bound to plasma proteins,^{17,27} 2 conditions that may be unfavorable to their transplacental transfer.²⁸ Indeed, drugs that likely cross the placenta are usually lipophilic, with a small molecular weight and low protein binding.²⁹ Of note, paclitaxel or docetaxel are highly bound to plasma proteins such as albumin and orosomucoid.⁴ Thus, plasma protein level may alter the placental transfer. Our results seem to confirm this theory, since albumin concentration interfered significantly in transplacental transfer of both drugs. We evidenced that higher concentrations of albumin lead to a lesser transplacental transfer of both drugs, with a significant difference between placentas perfused with albumin concentrations of 30 g/L (close to physiological concentra-

tion during late pregnancy) and 2 g/L (Table and Figure 3).

Regarding placental accumulation, to our knowledge, our data are the first documentation of placental uptake of taxane in physiological conditions of albumin concentration. This uptake was low, between 3.31–4.5% for paclitaxel and docetaxel, respectively. This uptake was correlated neither with FTR nor with clearance index.

Even if efflux transporters as P-gp could minimize this accumulation, taxanes were scarcely described as substrates of some influx transporters. Hence, for instance, paclitaxel was found to be a high-affinity substrate for the influx transporter organic anion-transporting polypeptide (OATP1B3) in the liver.³⁰ Similarly, in various cell lines, docetaxel was found to be a substrate of OATP1B-type carriers such as OATP1B1-3, other uptake transporters.³¹ Although data regarding influx transporters in placenta are scarce, placental accumulation of taxanes might be explained by the interplay between various efflux transporters (eg, P-gp) and uptake/influx transporters (eg, OATP1B types). This phenomenon could partially explain the variability observed between the different perfused cotyledons.³²

Otherwise, our data regarding placental accumulation of taxanes are in line with results from animal studies. Indeed, Van Calsteren et al⁹ evidenced a placental accumulation of taxanes 1 hour after perfusing baboons with the drugs.

The strength of our study was the use of a validated human *ex vivo* model, in 2 different albumin concentrations, subsequently demonstrating the crucial role of albumin concentration. Indeed, in agreement with previous studies^{19,33} and as recently documented by Hutson et al,³⁴ the placental perfusion model is useful in predicting whether the drug will have limited placental transfer.

Moreover, we studied for the first time to our knowledge the placental uptake of taxanes.

Conversely, the weakness of this study is in the limited number of perfused placentas. However, as described by Forestier et al,³³ our experimental conditions (low and physiological albumin concen-

trations) and the fact that taxanes are effluxed back into the maternal compartment make a small sample size of perfused placentas sufficient to demonstrate limited transfer.

From a pharmacological point of view, the formulation of Taxol includes polyethoxylated castor oil, a potent P-gp inhibitor that could theoretically favor the transplacental transfer of paclitaxel. Whether the use of alternative, Cremophor-free formulations of paclitaxel could result in lower transplacental transfer rates is unknown.

On the other hand, docetaxel is mainly metabolized by cytochrome P450 (CYP3A4), a phase I enzyme with an increasing activity during the third trimester of pregnancy,³⁵ making patients at risk of suboptimal exposure due to an increased CYP3A4-mediated clearance of docetaxel. Paclitaxel is mainly metabolized by CYP2C8, and to a lesser extent by CYP3A4,³⁶ but the kinetics of CYP2C8 activity during pregnancy is poorly documented. Clinical pharmacokinetic data on taxanes during pregnancy are limited.^{37,38} Compared to nonpregnant patients, pregnant women receiving paclitaxel had lower area under the curve and higher clearance, suggesting that conventional dosing schedules may result in suboptimal exposure as well.³⁷ Besides, there are no clinical data on docetaxel pharmacokinetics in pregnant women to date.

From a clinical point of view, weekly schedules of paclitaxel are expected to generate less severe hematological toxicities than three-week schedules of docetaxel.³⁹ Regarding the hazards of comedications, the use of paclitaxel with Cremophor EL (Taxol) makes mandatory the use of an antiallergic premedication (anti-H1 agents) due to the risk of hypersensitivity reaction to Cremophor EL. On the other hand, the use of docetaxel requires a premedication with corticosteroids (eg, dexamethasone or methylprednisolone).

Taken together, the existing data and ours do not allow for drawing a firm conclusion on the optimal selection of paclitaxel vs docetaxel for the treatment of pregnancy-associated malignancies. Further studies including *MDR1* and

CYP3A4/5 genotyping, as well as pharmacokinetic data from pregnant patients are needed to better handle these drugs in the obstetrical setting.

CONCLUSION

In this study, transplacental transfer rates of paclitaxel and docetaxel were found relatively low, and comparable with, those observed with doxorubicin and epirubicin. We failed to demonstrate any difference in term of transplacental transfer between the 2 drugs. These results are in line with the existing data on the short-term safety of taxanes during the second and third trimesters of pregnancy. Clinicians should be encouraged to report additional clinical and pharmacokinetic data on pregnant women treated with taxanes, to optimize the selection of chemotherapy agents in pregnant cancer patients. ■

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to sincerely thank Gerard Sanderink (Sanofi-Aventis), Audrey Chissey (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale Unit 767–Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité), and Christelle Simasotchi (PremUp Foundation–Université Paris Sud) for their important contribution in the study.

REFERENCES

1. Minino AM, Xu J, Kochanek KD, Tejada-Vera B. Death in the United States, 2007. *NCHS Data Brief* 2009;1-8.
2. Van Calsteren K, Heyns L, De Smet F, et al. Cancer during pregnancy: an analysis of 215 patients emphasizing the obstetrical and the neonatal outcomes. *J Clin Oncol* 2010;28:683-9.
3. Amant F, Deckers S, Van Calsteren K, et al. Breast cancer in pregnancy: recommendations of an international consensus meeting. *Eur J Cancer* 2010;46:3158-68.
4. Mir O, Berveiller P, Ropert S, et al. Emerging therapeutic options for breast cancer chemotherapy during pregnancy. *Ann Oncol* 2008;19:607-13.
5. Germann N, Goffinet F, Goldwasser F. Anthracyclines during pregnancy: embryo-fetal outcome in 160 patients. *Ann Oncol* 2004;15:146-50.
6. Mir O, Berveiller P, Rouzier R, Goffinet F, Goldwasser F, Treluyer JM. Chemotherapy for breast cancer during pregnancy: is epirubicin safe? *Ann Oncol* 2008;19:1814-5.
7. Grohard P, Akbaraly JP, Saux MC, et al. Transplacental passage of doxorubicin. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* 1989;18:595-600.

8. Gaillard B, Leng JJ, Grellet J, Ducint D, Saux MC. Transplacental passage of epirubicin. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* 1995; 24:63-8.
9. Van Calsteren KV, Verbesselt R, Devlieger R, et al. Transplacental transfer of paclitaxel, docetaxel, carboplatin, and trastuzumab in a baboon model. *Int J Gynecol Cancer* 2010;20: 1456-64.
10. Simister NE. Placental transport of immunoglobulin G. *Vaccine* 2003;21:3365-9.
11. Mir O, Berveiller P, Goffinet F, et al. Taxanes for breast cancer during pregnancy: a systematic review. *Ann Oncol* 2010;21:425-6.
12. Vaclavikova R, Soucek P, Svobodova L, et al. Different in vitro metabolism of paclitaxel and docetaxel in humans, rats, pigs, and minipigs. *Drug Metab Dispos* 2004;32:666-74.
13. Berveiller P, Mir O. Taxanes during pregnancy: probably safe, but still to be optimized. *Oncology* 2012;83:239-40.
14. Nekhayeva IA, Nanovskaya TN, Hankins GD, Ahmed MS. Role of human placental efflux transporter P-glycoprotein in the transfer of buprenorphine, levo-alpha-acetylmethadol, and paclitaxel. *Am J Perinatol* 2006;23:423-30.
15. Nanovskaya T, Nekhayeva I, Karunaratne N, Audus K, Hankins GD, Ahmed MS. Role of P-glycoprotein in transplacental transfer of methadone. *Biochem Pharmacol* 2005;69: 1869-78.
16. Schneider H, Panigel M, Dancis J. Transfer across the perfused human placenta of antipyrine, sodium and leucine. *Am J Obstet Gynecol* 1972;114:822-8.
17. Sonnichsen DS, Relling MV. Clinical pharmacokinetics of paclitaxel. *Clin Pharmacokinet* 1994;27:256-69.
18. Baker SD, Zhao M, Lee CK, et al. Comparative pharmacokinetics of weekly and every-three-weeks docetaxel. *Clin Cancer Res* 2004;10:1976-83.
19. Gavard L, Beghin D, Forestier F, et al. Contribution and limit of the model of perfused cotyledon to the study of placental transfer of drugs; example of a protease inhibitor of HIV: nelfinavir. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2009;147:157-60.
20. Mathiesen L, Mose T, Morck TJ, et al. Quality assessment of a placental perfusion protocol. *Reprod Toxicol* 2010;30:138-46.
21. Nagashige M, Ushigome F, Koyabu N, et al. Basal membrane localization of MRP1 in human placental trophoblast. *Placenta* 2003;24: 951-8.
22. Fromm MF. Importance of P-glycoprotein at blood-tissue barriers. *Trends Pharmacol Sci* 2004;25:423-9.
23. Gil S, Saura R, Forestier F, Farinotti R. P-glycoprotein expression of the human placenta during pregnancy. *Placenta* 2005;26:268-70.
24. Hoffmeyer S, Burk O, Von Richter O, et al. Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:3473-8.
25. Nakamura T, Sakaeda T, Horinouchi M, et al. Effect of the mutation (C3435T) at exon 26 of the MDR1 gene on expression level of MDR1 messenger ribonucleic acid in duodenal enterocytes of healthy Japanese subjects. *Clin Pharmacol Ther* 2002;71:297-303.
26. Kemper EM, Verheij M, Boogerd W, Beijnen JH, Van Tellingen O. Improved penetration of docetaxel into the brain by co-administration of inhibitors of P-glycoprotein. *Eur J Cancer* 2004;40:1269-74.
27. Clarke SJ, Rivory LP. Clinical pharmacokinetics of docetaxel. *Clin Pharmacokinet* 1999; 36:99-114.
28. Pacifici GM, Nottoli R. Placental transfer of drugs administered to the mother. *Clin Pharmacokinet* 1995;28:235-69.
29. Syme MR, Paxton JW, Keelan JA. Drug transfer and metabolism by the human placenta. *Clin Pharmacokinet* 2004;43:487-514.
30. Smith NF, Acharya MR, Desai N, Figg WD, Sparreboom A. Identification of OATP1B3 as a high-affinity hepatocellular transporter of paclitaxel. *Cancer Biol Ther* 2005;4:815-8.
31. De Graan AJ, Lancaster CS, Obaidat A, et al. Influence of polymorphic OATP1B-type carriers on the disposition of docetaxel. *Clin Cancer Res* 2012;18:4433-40.
32. DeGorter MK, Xia CQ, Yang JJ, Kim RB. Drug transporters in drug efficacy and toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2012;52:249-73.
33. Forestier F, De Renty P, Peytavin G, Dohin E, Farinotti R, Mandelbrot L. Maternal-fetal transfer of saquinavir studied in the ex vivo placental perfusion model. *Am J Obstet Gynecol* 2001;185:178-81.
34. Hutson JR, Garcia-Bournissen F, Davis A, Koren G. The human placental perfusion model: a systematic review and development of a model to predict in vivo transfer of therapeutic drugs. *Clin Pharmacol Ther* 2011;90:67-76.
35. Anderson GD. Pregnancy-induced changes in pharmacokinetics: a mechanistic-based approach. *Clin Pharmacokinet* 2005;44:989-1008.
36. Cresteil T, Monsarrat B, Alvinerie P, Treluyer JM, Vieira I, Wright M. Taxol metabolism by human liver microsomes: identification of cytochrome P450 isozymes involved in its biotransformation. *Cancer Res* 1994;54:386-92.
37. Lycette JL, Dul CI, Munar M, et al. Effect of pregnancy on the pharmacokinetics of paclitaxel: a case report. *Clin Breast Cancer* 2006; 7:342-4.
38. Van Calsteren K, Verbesselt R, Ottevanger N, et al. Pharmacokinetics of chemotherapeutic agents in pregnancy: a preclinical and clinical study. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2010;89: 1338-45.
39. Mauri D, Kamposioras K, Tsali F, et al. Overall survival benefit for weekly vs three-weekly taxanes regimens in advanced breast cancer: a meta-analysis. *Cancer Treat Rev* 2010;36: 69-74.

Article 3

Evaluation des répercussions placentaires après exposition aux taxanes par une association de modèles expérimentaux in vivo, ex vivo et in vitro

Après avoir dressé une cartographie spatio-temporelle d'un large spectre de transporteurs placentaires, et après avoir étudié le passage transplacentaire des différentes molécules de taxanes ainsi que leur accumulation cotylédonaire, nous avons voulu étudier quels étaient les impacts potentiels d'une exposition placentaire aux taxanes, et plus particulièrement au paclitaxel qui est la molécule majoritairement et préférentiellement utilisée à ce jour (Amant et al. 2014).

En effet, il existe actuellement un manque manifeste de données concernant les effets des chimiothérapies sur le placenta en tant qu'organe cible et plus particulièrement sur ses fonctions d'échange essentielles au développement du fœtus.

Les seules études disponibles ne renseignent que le poids et la taille du nouveau-né, et éventuellement son état clinique à la naissance. Hormis quelques publications précieuses comme de celle de Gziri et coll., très peu de données existent concernant le devenir de ces enfants exposés *in utero* à différentes molécules de chimiothérapies (Gziri et al. 2013).

Concernant les effets des chimiothérapies sur les grandes fonctions cellulaires comme par exemple le transport membranaire, quelques données existent notamment avec les transporteurs dont la molécule de chimiothérapie considérée est le substrat. Très récemment, chez l'animal, l'administration de paclitaxel semblait induire l'expression de transporteurs tels que la P-gp sans retrouver une induction du gène correspondant ABCB1 (Theile et al. 2014). Dans la même idée, toujours chez l'animal, une autre équipe a retrouvé une induction du gène ABCB1 après administration de paclitaxel (Ho et al. 2007). Ces données chez l'animal sont en accord avec les données précliniques indiquant que l'expression transcriptionnelle de certains transporteurs ABC semble régulée par des facteurs exogènes comme par exemple l'exposition à

certaines molécules, pouvant aboutir *in fine* à des phénomènes de chimiorésistance (Scotto et al. 2003 ; Huang et al. 2006).

Dès lors, dans cette dernière partie de notre travail, notre objectif a été d'étudier l'effet du paclitaxel, sur le trophoblaste placentaire et notamment sur l'expression des transporteurs placentaires.

Nous avons tout d'abord étudié :

- le passage transplacentaire *in vivo* du paclitaxel sur des cotylédons de femme enceintes traitées par paclitaxel durant leur grossesse pour un cancer du sein,
- Le passage transplacentaire *ex vivo* du paclitaxel et son accumulation cotylédonaire,
- Les effets *in vitro* du paclitaxel sur des cultures primaires de trophoblastes humains issus de placentas à terme,
- Les effets *in vitro* du paclitaxel sur l'expression protéique de deux transporteurs placentaires majeurs (P-gp et BCRP) à partir de cultures primaires de trophoblastes humains issus de placentas à terme,
- Les effets *in vitro* du paclitaxel sur l'expression génique des transporteurs placentaires ABC et SLC à partir de cultures primaires de trophoblastes humains issus de placentas à terme.

Matériel et méthodes

Passage transplacentaire in vivo du paclitaxel sur des cotylédons de femme enceintes traitées par paclitaxel durant leur grossesse pour un cancer du sein

Des placentas de femmes enceintes atteintes d'un cancer du sein (et quand cela a été possible, un tube de sang maternel et/ou un tube de sang de cordon) ont été collectés après consentement écrit, à la maternité de l'Hôpital Tenon et à la maternité Port-Royal (n=3). Ces patientes ont été traitées pour des cancers du sein survenus lors de la grossesse. Ces patientes ont reçu exclusivement ou non du paclitaxel (+/- des

chimiothérapies à base d'adryamycine et de cyclophosphamide). En attendant d'être collectés, les placentas étaient conservés dans du sérum physiologique, à 4°C.

Le placenta était ensuite observé macroscopiquement et un cotylédon était isolé, rincé dans l'HBSS puis conservé à -80°C en attente du dosage par LC-MS à l'Institut Gustave Roussy (avec les échantillons de sang maternel et/ou fœtal correspondants). Par ailleurs, quatre fragments pris de façon aléatoire sur quatre quadrants de la face maternelle (après exérèse de la plaque basale) étaient collectés, rincés puis congelés dans l'azote liquide. Ces derniers étaient stockés à -80°C.

- Préparation des différents réactifs :

- Solution mère : triéthanol amine (TEA) 0.1 m (13.3 ml/l pH : 7.5 avec HCl concentré)
- Solution 1 : TEA 10 mM - saccharose 8.5% (2 ml TEA 0.1mM + 1,7g/saccharose) : 20ml H₂O
- Solution 2 : TENTx - pour 1 ml : 5 ml de tris 2mM, pH : 7.4 ; 10 ml d'EDTA (acide éthylène diamine tétraacétique) 0.5mM, pH: 8 ; 10 ml de triton x100 ; 10 ml SDS 10% (sodium dodecyl sulfate)

Après avoir extrait les fragments du congélateur, une partie de ces fragments (environ 100 mg) était incubée en présence de 4 volumes de solution associés à des inhibiteurs de protéases (1 mL pour 100 mg de tissus). Puis, la solution était transférée dans un homogénéiseur de Dounce (placé au préalable dans la glace). Nous réalisons un broyage en réalisant des allers et retours (30 allers retours), précautionneusement, et en permanence dans la glace. L'ensemble était par la suite centrifugé à 500 rpm pendant 10 min à une température de 4°C.

Le surnageant était ensuite collecté, puis placé dans un tube Eppendorf pour être centrifugé à nouveau à 9000 rpm (12 000 g) pendant 20 minutes à 4°C. Le culot était ensuite repris dans la solution 1 sans saccharose (TEA 10 mM associé à des inhibiteurs de protéases) pour assurer un lavage. Une nouvelle étape de centrifugation s'en suivait, à 9000 rpm pendant 20 minutes à 4°C. Le culot était finalement repris dans 8 volumes de TENTx / gramme de culot. Nous réalisons par la suite une agitation temporaire pendant une heure, toujours à 4°C. Enfin, la solution était

centrifugée à 9000 rpm pendant 20 minutes à 4°C. Le surnageant était aliquoté et conservé à -80°C, en attendant les étapes de dosages de protéines puis les western blots pour étude de l'expression de la P-gp et de BCRP (cf. Article 1).

Passage transplacentaire ex vivo du paclitaxel et son accumulation cotylédonaire

Pour ce faire, nous avons utilisé le modèle du cotylédon perfusé, et utilisé le protocole décrit plus haut avec du paclitaxel à la C_{\max} (cf. Article 1). En revanche, nous avons utilisé un modèle de perfusion « plus » physiologique, avec des concentrations en albumine de 40 g/L et en faisant recirculer le perfusât maternel permettant un temps de perfusion plus long (3 heures).

Effets in vitro du paclitaxel sur des cultures primaires de trophoblastes humains issus de placentas à terme

Afin de déterminer la dose de paclitaxel à utiliser dans nos cultures, des courbes effet-dose ont été réalisées. Pour ce faire, des concentrations croissantes de paclitaxel ont été mises en contact avec les trophoblastes issus de cultures primaires.

A 24h de culture, 2 boîtes contenant des CT servaient de témoin, 2 boîtes étaient incubées à la C_{\max} du paclitaxel, 2 boîtes à $C_{\max} / 10$, 2 boîtes à $C_{\max} / 100$, 2 boîtes à $C_{\max} / 500$ et 2 à $C_{\max} / 1000$. La mortalité était déterminée après 24h d'incubation après un compte des cellules mortes à l'aide de bleu trypan.

Pour déterminer les effets du paclitaxel sur les trophoblastes, nous avons tout d'abord étudié la sécrétion d'hCG. Parallèlement à cela, nous avons calculé l'index de fusion cellulaire, à savoir la propension des CT à fusionner pour former du ST. Nous avons donc réalisé une immunocytochimie utilisant la desmoplakine et le DAPI, puis avons déterminé le nombre de noyaux cellulaires et de contours cellulaires. L'index de fusion était calculé selon la formule suivante : $(N-S)/T$, où N est le nombre de noyaux dans le ST, S correspond au nombre de ST, et T représente le nombre total de noyaux comptés. Les résultats de l'index de fusion sont ainsi donnés en pourcentage (Pidoux et al. 2007).

Effets in vitro du paclitaxel sur l'expression protéique de deux transporteurs placentaires majeurs (P-gp et BCRP) à partir de cultures primaires de trophoblastes humains issus de placentas à terme

Après 24h d'exposition, soit 48h de culture cellulaire, les cellules « témoins » et les cellules exposées au paclitaxel étaient collectées afin de récupérer un culot cellulaire nous permettant dans un second temps de réaliser les western blots après extraction des protéines (cf. Article 1). L'étude de l'expression protéique après exposition au paclitaxel était réalisée en utilisant deux anticorps visant des protéines fortement exprimées dans le placenta, la P-gp et la BCRP, selon la méthodologie décrite dans l'article 1 (cf. Article 1).

Effets in vitro du paclitaxel sur l'expression génique des transporteurs placentaires ABC et SLC à partir de cultures primaires de trophoblastes humains issus de placentas à terme

Après 24h d'exposition soit 48h de culture cellulaire, les cellules « témoins » et les cellules exposées au paclitaxel étaient collectées afin de récupérer un culot cellulaire nous permettant dans un second temps de réaliser une RT-qPCR après extraction des ARNm, en utilisant les plaques décrites plus haut (cf. Article 1). Ainsi, nous pouvions comparer l'expression transcriptionnelle au niveau des trophoblastes exposés ou non au paclitaxel et ainsi conclure sur un éventuel rôle du paclitaxel sur l'expression génique de ces derniers.

Résultats

Passage transplacentaire in vivo du paclitaxel sur des cotylédons de femmes enceintes traitées par paclitaxel durant leur grossesse pour un cancer du sein

Ces données de passage transplacentaire encore fragmentaires résumées dans le tableau suivant (Tableau 4), révèlent une accumulation cotylédonaire de paclitaxel persistante, y compris après un mois d'arrêt de la chimiothérapie, atteignant l'ordre du ng/g de tissu placentaire.

Par ailleurs, chez la patiente 2, trois semaines après l'arrêt du traitement par paclitaxel, la molécule injectée à une dose de 80 mg/m^2 est encore détectée dans le sang maternel à une concentration de 0,6 ng/ml alors qu'elle n'est plus détectée dans le sang fœtal.

Enfin, les données cliniques des enfants à la naissance révèlent dans un cas sur les 3 étudiés une hypotrophie attestée sur le poids et la taille de naissance (patiente 1).

	Age (years)	Gravida	Para	Familial history of breast cancer	Gestational age at diagnosis (WG)	Initiation of chemotherapy (WG)	Chemotherapy	Number of cycles of paclitaxel
Patient 1	36	2	1	Mother (43 years)	17	22	4 FEC 100 + weekly paclitaxel (80mg/m ²)	2
Patient 2	31	2	1	-	8	15	4 FEC 100 + weekly paclitaxel (80mg/m ²)	6
Patient 3	28	2	1	-	16	17	5 FEC 100 + weekly paclitaxel (80mg/m ²)	1

	Time between administration of chemotherapy and delivery (days)	Mode of delivery	Gestational age at delivery (WG)	Gender	Foetal weight (g)	Foetal length (cm)	Apgar score	Cotyledon accumulation of paclitaxel (ng/g)	Cotyledon weight (g)
Patient 1	7	Vaginal	37.57	Female	2370	45	10/10/10	10	34
Patient 2	21	Vaginal	37.71	Female	2770	48	10/10/10	3	12
Patient 3	30	Vaginal	37.71	Male	2810	49	10/10/10	2	20

Tableau 4: Caractéristiques des patients traitées par du paclitaxel durant la grossesse.

Passage transplacentaire ex vivo du paclitaxel et son accumulation cotylédonnaire

Dans le modèle de cotylédon perfusé, le taux de transfert fœtal moyen du paclitaxel est de $3.9 \pm 0.3\%$ (Fig. 29), et comparé à nos résultats antérieurs (Berveiller et al. 2012) (article 1), ce taux ne semble pas significativement modifié par une augmentation de la quantité d'albumine dans le compartiment maternel (30 à 40 g/L).

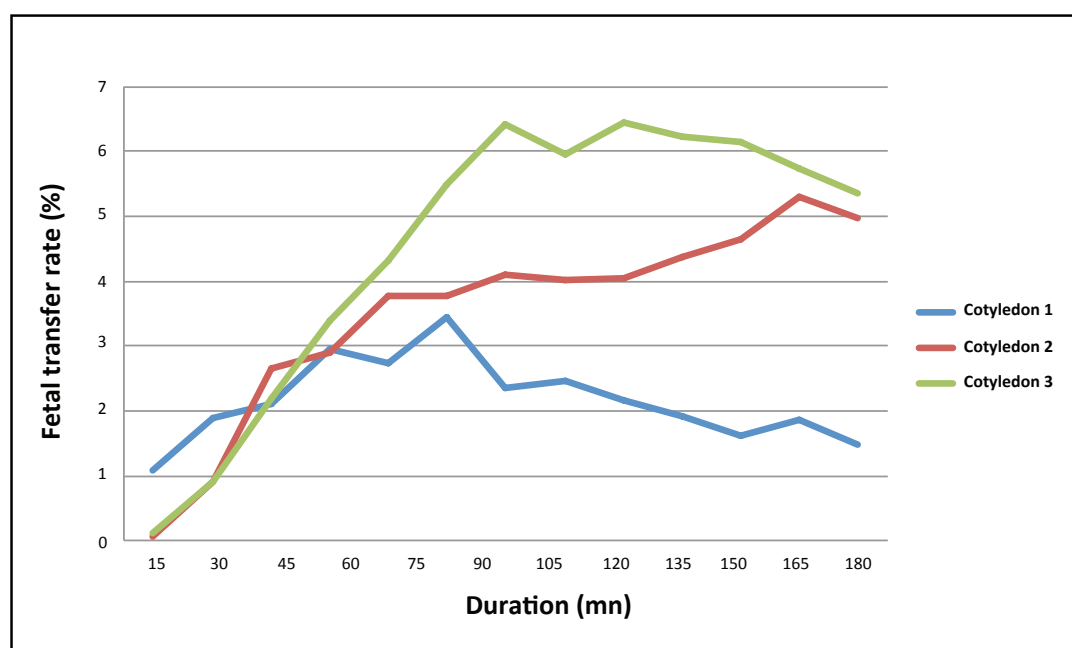


Figure 29: Evolution du taux de transfert fœtal de paclitaxel (TTF, %) en fonction de la durée de perfusion.

L'accumulation cotylédonnaire du paclitaxel est en cours d'évaluation mais ne devrait pas être très différente de celle observée lors de nos expériences de perfusion placentaire avec 30 g/L d'albumine (Berveiller et al. 2012), soit de l'ordre du mg/g de tissu placentaire.

Effets in vitro du paclitaxel sur des cultures primaires de trophoblastes humains issus de placentas à terme

Pour cette étude, la difficulté fut de cibler la dose de paclitaxel à utiliser *in vitro*. En effet, dans ces cultures primaires une forte toxicité était observée lors de l'exposition au paclitaxel avec une mort cellulaire de plus de 90% à la concentration maximale de C_{\max} correspondant à 4000 ng/mL (la C_{\max} du paclitaxel variant de 1500 à 4000 ng/mL selon les études), d'environ 30% à $C_{\max}/500$ soit 8 ng/mL (Fig. 30).

Nous avons donc utilisé une concentration de $C_{\max}/1000$ (4 ng/mL), non létale pour les cellules et correspondant à l'ordre de grandeur de la concentration observée dans le sang maternel chez la patiente 2, trois semaines après l'administration de paclitaxel.

Concernant la sécrétion d'hCG dans le milieu de culture des trophoblastes exposés au paclitaxel à $C_{\max}/1000$, elle n'était pas différente des témoins (Fig. 31), alors que cette sécrétion s'effondrait pour des concentrations supérieures de paclitaxel (données non représentées). Concernant l'index de fusion, celui-ci n'était pas statistiquement différent entre le groupe témoin et le groupe exposé au paclitaxel (Fig. 31).

Cette dose de paclitaxel de $C_{\max}/1000$ n'avait donc pas d'effet significatif sur la capacité de la cellule trophoblastique à former un syncytiotrophoblaste *in vitro*, ni sur la sécrétion d'hCG.

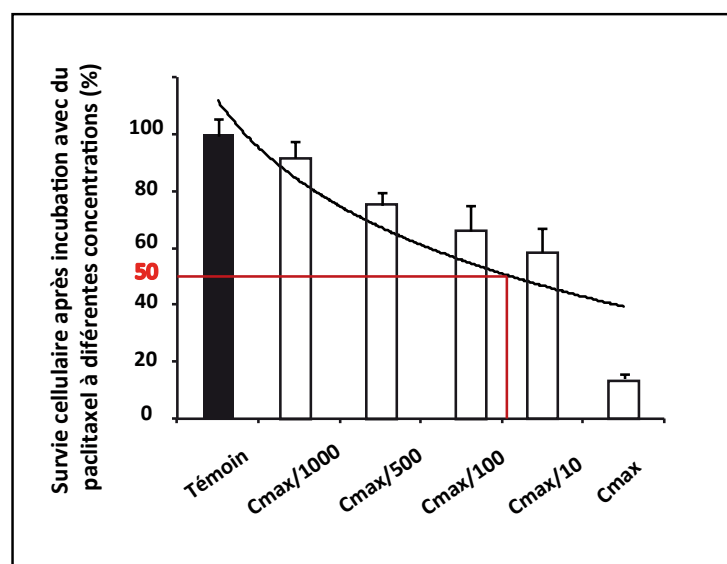


Figure 30: Graphique représentant la survie trophoblastique après 24h d'incubation avec différentes concentrations de paclitaxel (LD 50 en rouge).

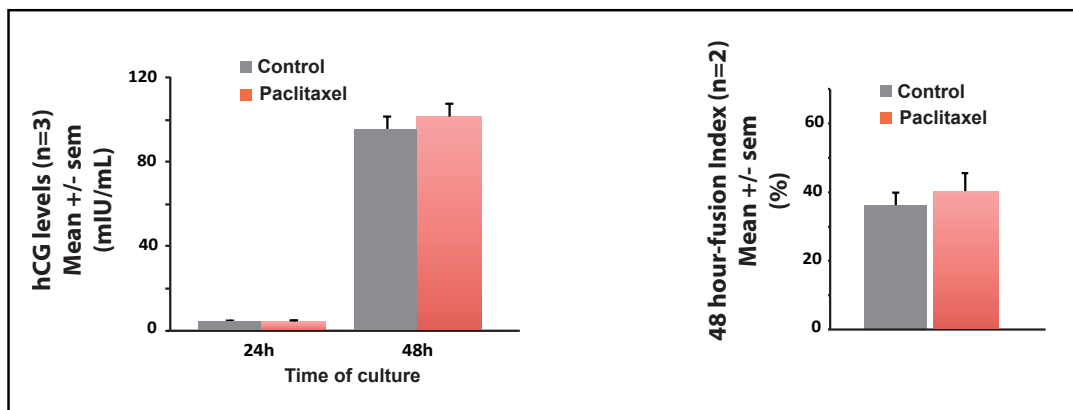


Figure 31: Graphique (gauche) représentant la sécrétion d'hCG dans des cultures de trophoblastes témoins et dans des cultures exposées au paclitaxel à la dose de $C_{max}/1000$. Graphique (droite) représentant l'index de fusion à 48h de CT en culture "témoins" et de CT exposés au paclitaxel à $C_{max}/1000$.

Effets in vitro et in vivo du paclitaxel sur l'expression protéique de deux transporteurs placentaires majeurs (P-gp et BCRP) à partir de cultures primaires de trophoblastes humains issus de placentas à terme et de cotylédons de patientes traitées par paclitaxel durant la grossesse

Nous avons étudié particulièrement l'expression de la P-gp et de la BCRP dont le paclitaxel est un substrat d'une part, et ces deux protéines étant connues pour être fortement exprimées au niveau placentaire dans les différents modèles étudiés d'autre part.

Dans nos expériences de culture cellulaire, nous avons révélé que ces deux transporteurs d'efflux ne sont pas modulés de façon significative dans leur expression protéique lors de l'exposition pendant 24h des cellules trophoblastiques au paclitaxel.

De plus, l'expression protéique de ces deux transporteurs n'est pas modifiée dans les cotylédons de placentas perfusés pendant 3 heures par le paclitaxel comparée à un pool de cotylédons de placenta à terme contrôle.

Enfin, dans les cotylédons placentaires des patientes sous chimiothérapie et de fait exposées de façon récurrente et prolongée au paclitaxel, une augmentation de l'expression de la P-gp et de BCRP est observée si la GAPDH est la protéine de référence, mais non si la CK7 (marqueurs spécifiques du trophoblaste) est la référence (Fig. 32).

Ces éléments pourraient suggérer un effet majeur du paclitaxel sur les autres composantes placentaires où ces transporteurs sont exprimés tels les vaisseaux fœtaux. Il faut cependant remarquer que l'expression de la GAPDH est très forte dans les placentas des patientes traitées et qu'un rôle direct du paclitaxel sur l'expression de cette dernière ne peut être exclu.

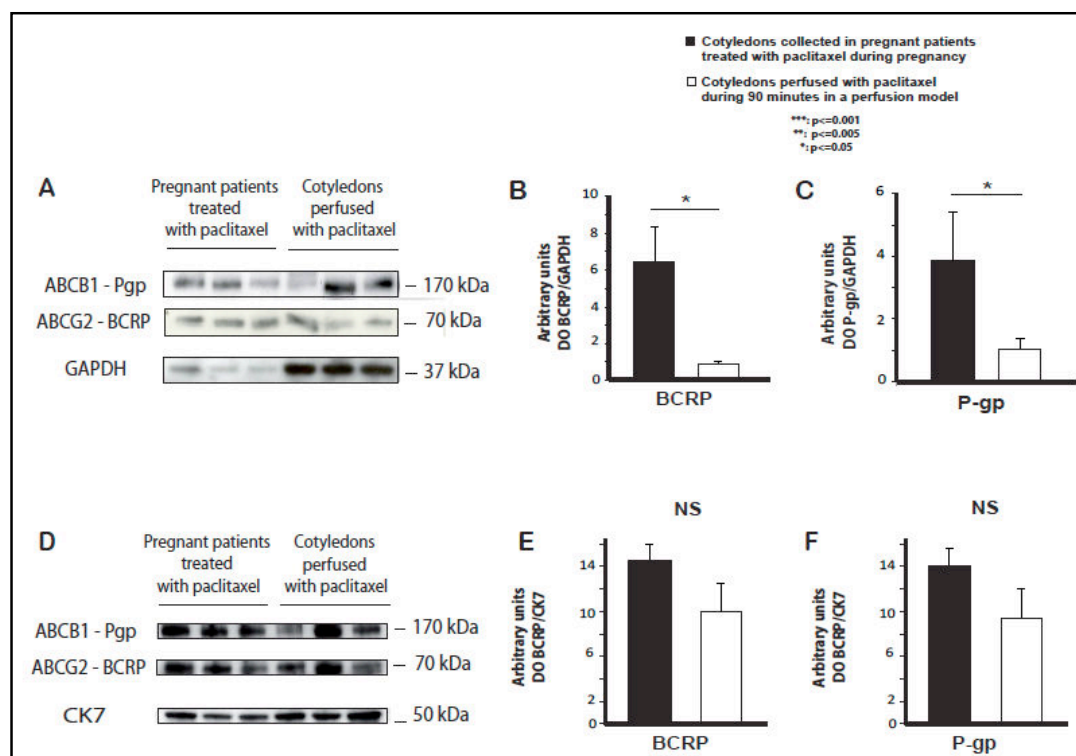


Figure 32: Expression protéique de P-gp et BCRP dans les cotylédons de patients traitées par paclitaxel Durant la grossesse et dans des cotylédons perfusés par du paclitaxel pendant 3 heures.

Effets in vitro du paclitaxel sur l'expression génique des transporteurs placentaires ABC et SLC à partir de cultures primaires de trophoblastes humains issus de placentas à terme

Par la même approche méthodologique décrite dans l'article 1, nous avons étudié la variation de l'expression des transporteurs ABC et SLC au niveau des cellules trophoblastiques exposées à cette même dose de paclitaxel.

Cette étude faite sur des cellules trophoblastiques purifiées de placentas à terme nous a permis de confirmer les résultats acquis (Article 1) et notamment l'expression de certains transporteurs encore non ou à peine décrits dans le placenta, tels ABCA9, SLC10A1, SLC16A3.

De façon tout à fait particulière sur les placentas étudiés (n=4), le seul effet observé était une diminution significative de l'expression d'un nombre restreint (n=11) de transporteurs, 4 de la famille des transporteurs ABC et 7 de la famille des SLC (Tableaux 5 et 6). Parmi ces derniers, certains tel à titre d'exemple SLC7A5 et SLC7A7 impliqués dans le transport des hormones thyroïdiennes, jouent un rôle important dans la physiologie fœtale.

Gene Symbol	Fold Regulation
ABCCA9	-1,6671
ABCC10	-1,637
ABCD1	-1,5182
TAP 2 (ABCB3)	-1,5139

Tableau 5: Evolution du taux d'ARNm des transporteurs placentaires ABC, après exposition au paclitaxel.

Gene Symbol	Fold Regulation
SLC10A1	-1,6105
SLC16A3	-1,7012
SLC28A3	-1,7593
SLC29A2	-1,6917
SLC7A5	-1,817
SLC7A7	-1,6549
SLCO3A1	-1,6612

Tableau 6: Evolution du taux d'ARNm des transporteurs placentaires SLC, après exposition de paclitaxel.

Discussion et conclusion

Nous avons montré dans cette dernière partie de notre travail plusieurs éléments de grande importance :

- dans un modèle *in vivo* de patientes traitées par chimiothérapie durant leur grossesse, le paclitaxel traversait la « barrière » placentaire. De plus, le paclitaxel semblait s'accumuler dans les cotylédons placentaires, nous permettant de penser qu'un phénomène de relargage est possible et ce, à distance des administrations. Enfin, le fait que le paclitaxel n'était pas détectable dans le sang fœtal à trois semaines de la dernière administration, semble confirmer le fait qu'il faille attendre (si possible) trois semaines entre la dernière cure de chimiothérapie et la naissance (Amant et al. 2014).
- Dans un modèle *ex vivo* de perfusion placentaire avec du paclitaxel, celui-ci traversait la barrière placentaire de façon certes faible mais significative, confirmant ainsi nos récents résultats (Berveiller et al. 2012), y compris dans un modèle « plus » physiologique (temps de perfusion de trois heures, concentration en albumine de 40 g/L).
- Dans un modèle *in vitro* de culture primaire de trophoblastes humains, l'administration de paclitaxel avait des effets sur la physiologie cellulaire. En effet, le paclitaxel utilisé à la C_{\max} induisait dans notre modèle une mortalité cellulaire quasi-totale, empêchant ainsi d'étudier la sécrétion d'hCG, la fusion cellulaire et a fortiori l'expression des transporteurs placentaires. Après dilution, à $C_{\max}/1000$, nous avons obtenu des taux de sécrétions en hCG et un index de fusion non statistiquement différents que dans le groupe témoin, nous permettant d'utiliser pour les autres expériences le paclitaxel à cette concentration.
- Dans le même modèle *in vitro* de culture primaire de trophoblastes, après exposition au paclitaxel, l'expression de P-gp et de BCRP ne semblait pas être modifiée de façon significative. Cette expression de P-gp et de BCRP fut aussi comparée entre notre modèle *in vivo* d'une part, et notre modèle *ex vivo* de

perfusion placentaire d'autre part, et les résultats étaient discordants. En fonction de la protéine de référence (GAPDH et CK7), l'exposition chronique au paclitaxel semblait induire de façon significative ces deux transporteurs dans le premier cas, alors que la différence n'était pas significative dans le dernier cas, respectivement. Ces données amènent différentes questions : un potentiel rôle direct du paclitaxel sur l'expression de GAPDH, même si d'autres équipes n'ont jamais trouvé d'expression différentielle (Thomadaki, Scorilas. 2008 ; Korbakis, Scorilas, 2012), un rôle du paclitaxel sur la P-gp et la BCRP exprimées dans d'autres cellules que les trophoblastes (endothélium des capillaires fœtaux par exemple).

- Dans notre modèle *in vitro* de culture primaire de trophoblastes, nous avons décrit une régulation de l'expression transcriptionnelle de 11 gènes ABC et SLC après administration de paclitaxel. Ces données confirment pour certains transporteurs leur expression dans le placenta humain (cf. Article 1). Par ailleurs, la paclitaxel pourrait avoir un effet et des répercussions significative sur la fonction placentaire puisque pour certains de ces gènes codants pour des transporteurs, certains semblent cruciaux dans la physiologie placentaire (comme par exemple SLC7A5 ou SLC 7A7) et ont été négativement régulés.

Nos résultats présentent des points positifs qui reposent essentiellement sur le fait que nous avons basé notre travail sur l'utilisation de plusieurs modèles de façon à confirmer nos résultats. Nous avons donc mêlé des modèles *in vivo*, *ex vivo*, et *in vitro*, ce qui en soit est un point crucial pour augmenter la fiabilité des résultats.

Par ailleurs, nous avons étudié plusieurs critères pour évaluer les potentielles répercussions du paclitaxel (morphologique avec l'index de fusion, biochimique avec la concentration en hCG, expression transcriptionnelle, expression protéique, taux de passage transplacentaire, accumulation cotylédonaire, concentration dans le sang maternel et de cordon, etc.)

Nos limites reposent sur plusieurs points : des effectifs faibles, notamment concernant les données des femmes atteintes de cancer durant la grossesse ; des durées courtes d'exposition au paclitaxel dans les cultures primaires (limite du modèle de culture primaire valide uniquement 3 jours) ; pas d'étude de l'expression protéique de l'ensemble des transporteurs étudiés sur le versant transcriptionnel.

Cette étude préliminaire qui nécessite de conforter ces résultats par un plus grand nombre d'échantillons, souligne cependant l'importance de considérer les effets potentiels des molécules de chimiothérapies sur le placenta en tant qu'organe dont les fonctions sont essentielles au bon développement du fœtus.

Cet article est en cours de préparation, 2014.

Discussion et perspectives

Comme nous l'avons vu, le cancer du sein est un problème de santé publique et sa survenue chez la femme enceinte devient de plus en plus fréquente compte tenu de l'âge croissant des femmes lors de la première grossesse dans les sociétés industrialisées.

La question du traitement de la femme enceinte atteinte de cancer du sein est complexe, mais les données récentes vont dans le sens d'un traitement possible par chimiothérapie à partir du deuxième trimestre de la grossesse (Amant et al. 2014). Les chimiothérapies qui peuvent être utilisées sont superposables à celles de la patiente non enceinte, et a priori aux mêmes doses, à savoir les anthracyclines, le cyclophosphamide, et les taxanes avec une préférence pour le paclitaxel compte tenu de sa moindre toxicité maternelle par rapport au docétaxel (Amant et al. 2014). Ces derniers sont de plus en plus utilisés de nos jours dans le cancer du sein d'une part, mais aussi dans les cancers du poumon et de l'ovaire d'autre part (Amant et al. 2014). Même si les rares données cliniques rétrospectives (avec un recul à très court terme) semblent plutôt rassurantes pour les taxanes, il n'existe cependant pas dans la littérature de données claires concernant le potentiel passage transplacentaire du paclitaxel, et *a fortiori* du docétaxel.

De plus, hormis les données de passage transplacentaire, les taxanes pourraient avoir de potentiels effets sur le placenta humain aboutissant à des répercussions éventuellement sérieuses notamment sur la fonction essentielle du transport placentaire, mais ceux-ci n'ont jamais été étudiés ou abordés.

Dès lors, notre travail s'est axé autour de trois points en utilisant plusieurs approches méthodologiques :

1- Utilisation de la méthode de culture primaire de trophoblastes humains afin d'étudier l'expression des transporteurs placentaires au cours de la grossesse.

Dans cette première partie du travail, nous avons voulu apporter pour la première fois une cartographie d'expression d'un large panel de transporteurs placentaires de médicaments, et ce, tout au long de la grossesse (du premier au troisième trimestre de

la grossesse) et dans les différents types de trophoblaste, à savoir le CT et le ST. En effet, le CT et le ST ont des rôles décisifs, notamment dans le passage transplacentaire, car ils font partie intégrante de la « barrière » placentaire, composée en plus de tissu mésenchymateux et de la paroi endothéliale des capillaires fœtaux (Myren et al. 2007). Le CT forme une assise unique et continue de cellules mononuclées qui au cours de la différenciation va aboutir à la fusion d'une partie d'entre elles pour venir former le ST (Pidoux et al. 2007; Kliman et al. 1986). Ce ST est au contact direct du sang maternel via sa face apicale pourvue d'une bordure en brosse microvillositaire (Johnson et al. 1981). En fin de grossesse, le CT a tendance à devenir de moins en moins abondant au profit du ST, *a contrario* du début de grossesse où le CT est très abondant. Ces modifications locales et temporelles vont donc avoir des conséquences en termes de passage transplacentaire des différentes molécules. Enfin, les transporteurs placentaires exprimés ne sont pas identiques entre le CT et le ST (Vahakangas et al. 2009), ce qui va aboutir à des changements importants dans le passage de cette « barrière » placentaire, *a fortiori* entre le premier et le troisième trimestres de la grossesse.

Pour étudier cela, nous avons utilisé une méthode originale de culture cellulaire primaire de trophoblastes humains purifiés.

Après avoir validé notre modèle à partir de deux transporteurs de référence (ABCB1/P-gp et ABCG2/BCRP), nous avons donc détaillé pour la première fois l'expression génique placentaire humaine de plus de 80 transporteurs tout au long de la grossesse, aussi bien au niveau des CT que des ST, afin de dresser une cartographie spatio-temporelle de ces transporteurs.

Cette importante cartographie d'expression génique des transporteurs placentaires de médicaments est une base originale, fondamentale et nécessaire afin de mieux comprendre le passage transplacentaire des médicaments et ainsi, éventuellement d'optimiser l'utilisation de substances médicamenteuses durant cette période cruciale qu'est la grossesse. Le fait d'avoir utilisé un modèle purifié a permis de contrecarrer les critiques qui pouvaient être faites concernant les études antérieures utilisant des modèles expérimentaux discutables (tissu placentaire total contenant de nombreux types cellulaires, lignées cellulaires cancéreuses non comparables au trophoblaste

humain, etc.) (Nishimura et al. 2005 ; Serrano et al. 2007).

L'utilisation de notre modèle de culture primaire nous a également permis d'étudier spécifiquement le CT et le ST, au premier et au troisième trimestre, et d'en décrire les principales différences en termes d'expression de transporteurs placentaires.

Cependant, même si cette étude transcriptionnelle est un point crucial et préliminaire, d'autres études sont nécessaires pour apprécier l'expression de ces transporteurs placentaires sur le plan protéique afin de venir ou non corroborer nos résultats. En effet, il semble exister parfois des résultats discordants entre l'expression génique et protéique, notamment pour ABCB1/P-gp (Theile et al. 2014). De plus et dans la même idée, des études de fonctionnalité (avec utilisation d'inhibiteur par exemple) sont également utiles afin de confirmer les résultats initiaux d'une part (Nanovskaya et al. 2005), mais aussi de préjuger des potentielles interactions médicamenteuses lors de l'utilisation de plusieurs anticancéreux d'autre part. Cela pourrait être intéressant lors de l'utilisation d'une molécule étant le substrat de deux transporteurs différents (P-gp et BCRP pour le paclitaxel par exemple) ou de deux molécules étant transportées par le même transporteur (paclitaxel et épirubicine utilisés conjointement dans les protocoles de chimiothérapie de cancer du sein).

2- Etude comparative du passage transplacentaire des taxanes avec utilisation du modèle de cotylédon placentaire perfusé.

Dans cette deuxième partie de notre travail, en utilisant le modèle du cotylédon placentaire humain perfusé qui est à ce jour le modèle *ex vivo* de référence afin d'étudier le passage transplacentaire des médicaments, nous avons comparé les passages transplacentaires de deux molécules de taxanes, le paclitaxel et le docétaxel, tous deux indifféremment utilisés dans le cancer du sein. Par ailleurs, leur accumulation placentaire a également été étudiée, ce qui n'avait jamais été décrit auparavant.

Nous avons mis en évidence que les passages transplacentaires du paclitaxel et du docétaxel étaient comparables et relativement faibles, ainsi que leur accumulation cotylédonaire respective. Concernant l'impact de la concentration en albumine dans le

compartiment maternel, plus celle-ci était basse, plus le passage transplacentaire était important, confirmant les principes théoriques du passage transplacentaire (Syme, Paxton, and Keelan 2004).

Ces données originales fournissent donc un rationnel minimum pour l'utilisation des deux molécules de taxanes disponibles sur le marché, et rassurent quant à leur passage transplacentaire. Ces données issues d'un modèle *ex vivo*, viennent corroborer les résultats *a priori* rassurants issus des revues cliniques de la littérature disponibles à ce jour.

3- Evaluation des répercussions placentaires après exposition aux taxanes par un modèle de culture primaire de trophoblastes humains.

Dans cette dernière partie de notre travail, nous nous sommes intéressés aux effets de la chimiothérapie sur le placenta en tant qu'organe cible et sur ses fonctions d'échange essentielles au développement du fœtus. En effet, les effets des chimiothérapies sur le placenta sont pour le moment peu voire non étudiés, *a fortiori* pour les taxanes pour lesquels les données sont inexistantes. Nous avons donc étudié l'effet du paclitaxel sur le placenta humain et notamment sur l'expression de ses transporteurs membranaires. Pour cette étude nous avons utilisé l'association originale de plusieurs modèles expérimentaux : le modèle de culture primaire de trophoblaste humain d'une part, un modèle *in vivo* utilisant des cotylédons issus de patientes ayant été traitées par du paclitaxel durant leur grossesse d'autre part, et enfin, le modèle du cotylédon placentaire humain perfusé dans des conditions physiologiques.

Nous avons mis en évidence que lors de l'administration de paclitaxel chez la femme enceinte, celui-ci s'accumulait également au niveau des cotylédons et ce, de façon persistante y compris un mois après la dernière cure de chimiothérapie.

Par ailleurs, en utilisant des conditions physiologiques dans un système de perfusion de cotylédon humain (taux d'albuminémie à 40 g/L, durée de perfusion longue dans un système « semi-fermé »), le taux de transfert fœtal du paclitaxel était d'environ $3.9 \pm 0.3\%$ et comparable aux données antérieures utilisant des doses plus faibles d'albumine (Berveiller et al. 2012).

En outre, dans un modèle de culture primaire de trophoblastes humains exposés au

paclitaxel à des doses n'altérant pas les fonctions physiologiques de fusion et de sécrétions d'hCG, le seul effet observé était une diminution significative de l'expression d'un nombre restreint (n=11) de transporteurs, à savoir quatre de la famille des transporteurs ABC et sept de la famille des SLC. Parmi ceux-là, certains d'entre eux jouent un rôle primordial dans la physiologie fœtale comme par exemple les transporteurs d'hormones thyroïdiennes (SLC7A5 et SLC7A7) (Loubiere et al. 2010). Ainsi, l'exposition au paclitaxel, y compris à des doses faibles, avait des effets significatifs sur le fonctionnement placentaire.

Enfin, nous avons voulu comparer les effets d'une perfusion de 3 heures de paclitaxel par rapport à une exposition chronique chez les femmes enceintes sur l'expression de ABCB1/P-gp et ABCG2/BCRP, tous deux fortement exprimés dans le placenta humain.

Nos résultats ont été discordants : dans les cotylédons placentaires des patientes traitées par paclitaxel et de fait exposées de façon récurrente et prolongée, une augmentation de l'expression de la P-gp et de BCRP était observée si la GAPDH était prise comme protéine de référence, mais non si la CK7 (marqueur spécifique du trophoblaste) était la référence.

Il est ainsi possible que le paclitaxel ait eu un effet majeur sur les autres composantes des villosités choriales placentaires où ces transporteurs sont exprimés, tels que les vaisseaux fœtaux par exemple. Par ailleurs, le fait que le signal de la GAPDH était intense dans les échantillons de patientes traitées durant la grossesse amène à se poser la question d'un potentiel rôle joué par le paclitaxel sur l'expression même de la GAPDH, et ce, même si d'autres études n'ont pas semblé retrouver cette association (Thomadaki, Scorilas. 2008 ; Korbakis, Scorilas, 2012).

Nos résultats mettent donc en évidence la nécessité de prendre en compte outre le passage transplacentaire d'une chimiothérapie, ses effets sur le placenta en tant qu'organe, dont les fonctions de transport sont essentielles au bon développement du fœtus.

4- Perspectives futures

Notre travail apporte des éléments originaux qui seront la base des études ultérieures

portant sur la thématique des transporteurs placentaires et sur l'utilisation des chimiothérapies pendant la grossesse.

Cependant, certaines limites doivent être discutées ici. En effet, notre cartographie reflète l'expression génique de plus de 80 transporteurs placentaires tout au long de la grossesse, mais une étude des protéines correspondantes apporterait des données complémentaires qui nous permettraient de corroborer ou non nos résultats.

Concernant la perfusion de paclitaxel dans les cotylédons perfusés, l'utilisation de concentration plus faibles et/ou plus importantes permettraient de mettre ou non en évidence un effet dose/passage qui n'a pour l'heure jamais été documenté, ainsi qu'une possible relation entre dose et accumulation cotylédonaire.

Enfin, concernant les effets des taxanes sur le placenta, nos données cliniques sont très fragmentaires du fait d'un nombre restreint de cas. Un nombre plus important de cotylédons exposés de façon chronique au paclitaxel ainsi que les sérums maternels et fœtaux correspondants est nécessaire afin de préciser nos résultats qui sont pour l'heure encore discordants.

Les différentes pistes à suivre pour le futur concernant l'utilisation des chimiothérapies pendant la grossesse repose sur une approche multimodale :

- S'assurer de la déclaration systématique des cas de cancers survenant pendant la grossesse afin de rendre les bases de données cliniques déjà disponibles plus exhaustives (rôle des réseaux tels que le groupe de travail « Cancers Associés à La Grossesse »). Ceci nous permettrait d'obtenir un nombre plus important de cas et donc plus d'échantillons à exploiter pour les études futures.
- Améliorer le recueil de l'ensemble des données. En effet, la plupart des cas déclarés sont souvent présentés de façon incomplète, or les données doivent être les plus exhaustives possible afin de préciser nos résultats (poids, taille, détail des molécules utilisées, nombre de cures, doses, croissance fœtale, poids du placenta, état néonatal, recherche de cytopénies du nouveau-né, etc.).
- Mettre en place, comme c'est le cas dans d'autres pays Européens (Belgique), un suivi pédiatrique des enfants ayant été exposés aux différentes chimiothérapies pendant la vie fœtale. L'exemple le plus parlant est celui de la cohorte d'enfants explorés sur le plan cardiaque après avoir été exposés aux anthracyclines durant la vie fœtale, ces dernières étant cardiotoxiques (Gziri et

al. 2013). En effet, les données expérimentales qui sont certes fondamentales, doivent être confortées par les études cliniques comprenant notamment le suivi à long terme de ces enfants.

- Mettre en place des études de pharmacocinétique chez la femme enceinte. En effet, les données sont pour l'heure très fragmentaires et les réflexions actuelles font état d'une possible augmentation des doses qui serait nécessaire chez la femme enceinte compte tenu des modifications métaboliques accompagnant la grossesse (Van Calsteren, Verbesselt, et al. 2010; Lycette et al. 2006).
- Rendre plus systématique le recueil biologique des placentas, du sang de cordon et du sang maternel au moment de l'accouchement. Ces données sont actuellement trop rares pour pouvoir élaborer des recommandations, mais nos résultats sont encourageants et nécessitent d'augmenter les échantillons à étudier, de façon à avoir une puissance suffisante pour obtenir une interprétation exacte.
- Sur le plan de la recherche fondamentale, les perfusions placentaires apportent des données cruciales, notamment pour les anticancéreux utilisés moins fréquemment ou pour lesquels aucune information n'est disponible. Dès lors, toutes les molécules anticancéreuses potentiellement utilisables chez la femme enceinte devraient être perfusées à l'aide du modèle du cotylédon perfusé. Ceci apporterait une base de donnée originale qui permettrait à terme d'aider significativement les praticiens dans leur exercice quotidien.
- Apporter des données de métabolisme placentaire qui sont pour l'heure inconnues pour l'essentiel des chimiothérapies alors que de nombreuses enzymes du métabolisme telles que certains cytochromes sont exprimés dans le placenta humain (Pasanen. 1999). En effet, l'utilisation du modèle *ex vivo* du cotylédon perfusé, mais sur un mode « fermé/fermé », à savoir avec recirculation du perfusât maternel et du perfusât fœtal sur plusieurs heures, permettrait de fournir ces informations importantes, que la perfusion « en ouvert » ne permet pas à elle seule (Abumaree et al. 2014).
- Apporter des éléments de mécanistique pour affiner les connaissances concernant les transporteurs placentaires. En effet, l'utilisation d'inhibiteurs ou d'inducteurs de ces transporteurs peut permettre de confirmer d'une part la

présence de ces derniers, mais aussi de confirmer leur rôle au niveau des barrières biologiques (Nanovskaya et al. 2005). Ces éléments sont cruciaux pour étudier plus précisément le passage transplacentaire des médicaments.

- Ces données de passage transplacentaire des différentes molécules de chimiothérapie sur modèle *ex vivo* doivent être associées à des données de toxicité placentaire directe de ces mêmes molécules. Ceci permettra d'aborder l'utilisation des chimiothérapies durant la grossesse de façon plus précise et plus sécuritaire pour les patientes.
- Etudier également l'expression trophoblastique des transporteurs placentaires sur le versant protéique, afin de confirmer (ou non) nos résultats issus d'étude transcriptionnelle.
- Etudier l'expression des principaux transporteurs de médicaments au niveau transcriptionnel et protéique sur les autres éléments de la « barrière » placentaire. En effet, il existe d'autres types cellulaires au sein de la villosité chorale dont il y a fort à penser que le rôle est également crucial (endothélium, cellules mésenchymateuses) (Vahakangas and Myllynen 2009). Cette étude permettrait de mieux définir la répartition de ces transporteurs placentaires au sein même de la villosité et de mieux comprendre leur fonction au sein de l'unité villositaire.

Conclusion

L'ensemble de notre travail a donc permis d'élaborer une cartographie génique physiologique d'expression des transporteurs placentaires, et ce, tout au long de la grossesse ainsi que dans le CT et le ST, éléments qui n'avait jamais été décrits en utilisant un modèle purifié comme le notre. De plus, notre travail a conforté l'idée que les taxanes traversent peu le placenta, même si une accumulation cotylédonaire était mise en évidence, pouvant aboutir à des effets de relargage à plus ou moins long terme. Enfin, l'administration de paclitaxel semble avoir des effets significatifs sur le placenta humain, notamment sur l'expression de ses transporteurs membranaires qui sont pour certains fortement impliqués dans la physiologie fœtale.

Notre travail original, présentant des points forts et des limites, nécessite la réalisation d'études ultérieures pour préciser nos données et les confirmer le cas échéant.

Ces études futures devront être menées chez des femmes enceintes atteintes de cancer et traitées par chimiothérapie durant la grossesse d'une part, et à partir de données expérimentales complémentaires issues des modèles de référence mentionnés ci-dessus, afin d'améliorer les connaissances concernant cet événement dramatique qu'est la survenue d'un cancer pendant la grossesse, et au final, d'aider les praticiens à prendre en charge de façon optimale ces patientes.

Publications additionnelles

1- Berveiller et al. *Am J Obstet Gynecol*. 2012 Jan;206(1):92.e1-6.

RESEARCH

www.AJOG.org

BASIC SCIENCE: OBSTETRICS

Transplacental transfer of oseltamivir and its metabolite using the human perfused placental cotyledon model

Paul Berveiller, MD, MSc; Olivier Mir, MD, MSc; Cécile Vinot, MSc; Céline Bonati; Patrick Duchene, PhD; Carole Giraud, PhD; Sophie Gil, PhD; Jean-Marc Treluyer, MD, PhD

OBJECTIVE: Given the lack of data regarding the use of oseltamivir (Tamiflu) during pregnancy, we aimed to evaluate the placental transfer of oseltamivir phosphate and its active metabolite oseltamivir carboxylate, using the perfused placental cotyledon model.

STUDY DESIGN: Cotyledons were coperfused with oseltamivir phosphate and oseltamivir carboxylate using the maximal concentrations described with a 75 mg, twice-daily oral dose. Main transfer parameters such as fetal transfer rate (FTR) and clearance index (CI) were assessed.

RESULTS: Five placentas were coperfused with oseltamivir phosphate and oseltamivir carboxylate. The median FTR of oseltamivir phosphate

was 8.5% (range, 5.0–11.6%) and the median CI was 0.3 (range, 0.2–0.6). Regarding oseltamivir carboxylate transplacental transfer, the median FTR was 6.6% (range, 3.9–9.7%), whereas the median CI was 0.2 (range, 0.2–0.5).

CONCLUSION: A transplacental transfer of oseltamivir phosphate and its metabolite oseltamivir carboxylate was detected and might have clinical relevance. Clinicians should be encouraged to report oseltamivir treatment outcomes during pregnancy.

Key words: influenza, oseltamivir, placenta, pregnancy, transplacental transfer

Cite this article as: Berveiller P, Mir O, Vinot C, et al. Transplacental transfer of oseltamivir and its metabolite using the human perfused placental cotyledon model. *Am J Obstet Gynecol* 2012;206:92.e1-6.

Approximately 20% of the world's population is annually affected by influenza,¹ leading to 40,000 deaths in United States every year.² In 2009, a novel strain of avian influenza virus (A/H1N1v) rapidly spread over to many countries in the world. Thus, in April 2009, the World Health Organization decided to raise the level of influenza pandemic alert from phase 4 to phase 5.³

According to recent data from the Centers for Disease Control and Prevention, A/H1N1v seemed to be also sensitive to neuraminidase inhibitors antiviral

agents such as oseltamivir or zanamivir during the active phase of disease.⁴ These drugs are recommended for all infected persons who are at increased risk for complications⁵ because they potentially reduce duration of symptoms, number of hospitalizations, and complications such as pneumonia and otitis.⁶ Moreover, antiviral therapies should be associated with annual influenza vaccination to be highly effective.⁷ Indeed, vaccination significantly reduces the occurrence of hospitalization and death in high-risk patients.⁸

Oseltamivir phosphate (Tamiflu; F. Hoffmann-La Roche Ltd, Basel, Switzerland) is a prodrug, which is biotransformed into an active metabolite (oseltamivir carboxylate) by carboxylesterases.⁹ This active metabolite inhibits the activity of influenza type A and B neuraminidases (glycoproteins localized on the virions surface) and therefore interferes with the release of novel viral particles.¹⁰

Among the high-risk group of patients, 2 categories of healthy persons also present an increased risk of complications: neonates (0-6 months) and pregnant women. Indeed, pregnancy is associated with a high risk of severe complications such as pneumoniae or acute respiratory distress syndrome.¹¹ Given the risk of severe outcomes in pregnant patients, influenza vaccination is recommended in this population.⁷ Moreover, pregnant patients should also be treated with curative and prophylactic antiviral therapies.^{4,12,13}

Recent data (mainly retrospective data and case series) recommended preferential use of oseltamivir rather than zanamivir because zanamivir-induced fetal toxicity has been less studied or described in pregnant patients.¹⁴

However, given the paucity of data regarding the use of oseltamivir in pregnant patients, these recommendations

From the Clinical Research Unit, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale CIC P 0901, Cochin Teaching Hospital, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Université Paris Descartes, Paris, France (Drs Berveiller, Mir, Vinot, Giraud, and Treluyer), PremUp Foundation, Pharmaceutical and Biological Sciences Faculty, Université Paris Descartes, Paris, France (Drs Berveiller and Gil), Eurofins ADME Bioanalyses, Vergèze, France (Drs Bonati and Duchene), and EA 2706, Pharmaceutical Faculty, Université Paris Sud, Chatenay-Malabry, France (Dr Gil).

Received April 4, 2011; revised June 20, 2011; accepted July 13, 2011.

All oseltamivir phosphate and carboxylate concentrations were measured at Eurofins ADME Bioanalyses Laboratories. These dosages were funded by F. Hoffmann-La Roche Ltd Laboratories. O.M. received consultancy honoraria from Servier and F. Hoffmann-La Roche Ltd. Other authors report no conflict of interest.

Reprints: Paul Berveiller, MD, MSc, PhD student, PremUp Foundation, Pharmaceutical and Biological Sciences Faculty, 4 Avenue de l'Observatoire, F75006 Paris, France. paul.berveiller@sat.aphp.fr.

0002-9378/\$36.00 • © 2012 Mosby, Inc. All rights reserved. • doi: 10.1016/j.ajog.2011.07.023

leave questionable the fetal risk of the use of oseltamivir during pregnancy. Although most published data seem to be reassuring,¹⁵ emerging controversial publications of neuropsychiatric events in infants and adolescents treated with oseltamivir are scarcely reported.^{0,16} To date, little is known on the potential side effects of oseltamivir on the mother and the fetus. In particular, data are scarce on the transplacental transfer of oseltamivir in pregnant women. Thus, oseltamivir safety profile needs to be further evaluated with pharmacokinetic and transplacental transfer studies to derive firm conclusions and recommendations.⁴

To date, only 1 study investigated the transplacental transfer of oseltamivir and showed a low transplacental transfer of oseltamivir, even at supratherapeutic concentrations of oseltamivir phosphate.⁷ However, no data were available regarding the transplacental transfer of oseltamivir carboxylate, the active metabolite of oseltamivir phosphate.

In view of the limited data currently available,¹⁵ we aimed to determine the transplacental transfer of oseltamivir and its metabolite, using the ex vivo gold standard method of the perfused cotyledon.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Term placentas (37–41 weeks of gestational age) collected from uneventful pregnancies were immediately collected ($n = 5$) after vaginal delivery. The enrolled patients did not receive any medication except for epidural analgesia or oxytocin during labor and did not present any vascular comorbidity such as diabetes mellitus, preeclampsia, or intrauterine growth restriction. Each patient gave a written informed consent prior to study inclusion. The study was approved by the local ethics committee.

The maternal and fetal solutions were prepared with Earle medium containing 2 g/L bovine serum albumin (Euromedex, Souffel Weysersheim, France). Oseltamivir phosphate (Op) and oseltamivir carboxylate (Oc) powder was provided by F. Hoffmann-La Roche Ltd (Basel, Switzerland).

The targeted maternal compartment concentrations of Op and Oc were around the maximal plasmatic concentration described in the literature for nonpregnant patients treated with a twice-daily oral dose of 75 mg (ie, 20 and 125 ng/mL, respectively).^{9,18,19}

Methods

Collected placentas were subsequently perfused in an open (nonrecirculating) double circuit according to the method initially described by Schneider et al²⁰ subsequently modified as recently described.²¹ Perfusion experiments were started within 30 minutes after delivery. After a visual examination to confirm vascular integrity of both maternal and fetal sides, a distal branch of a fetal artery and its associated vein that were supplying a peripheral cotyledon were cannulated.

The fetal circulation was established at a flow rate of 6 mL/min. After confirmation of absence of vascular leakage, the perfused area progressively whitened, which allowed visualization of the selected cotyledon. The perfusion was subsequently initiated by insertion of 2 catheters into the intervillous space on the maternal side. The maternal circulation was established at a flow rate of 12 mL/min. The values of pH in maternal and fetal reservoirs were adjusted to 7.4 and 7.2, respectively.

Parameters such as perfusion pressure in the fetal vasculature and fluid leakage from the fetal to the maternal circulation are usually monitored to check the validity of the technique. This is determined during the experiment by controlling, in the fetal circuit, the balance of flows in the portions corresponding to the arterial and venous circulation. Similarly, perfusion pressure and its stability are measured during controlled experiment. Usually the values are between 40 and 60 mm Hg for the fetal circulation and between 10 and 20 mm Hg for the maternal circulation.

Combination of Op, Oc, and the freely diffusing marker antipyrine (Ap) were added into the maternal compartment for 90 minutes. Samples from the maternal reservoir were collected at 0, 30, 60, and 90 minutes, whereas samples from venous fetal circulation were collected

every 5 minutes up to 90 minutes to assess Op and Oc concentrations.

Concentrations of Op and Oc were measured by liquid chromatography–mass spectrometry. Stable labeled isotopes ($^2\text{H}_5$ -oseltamivir and $^{13}\text{CD}_3$ -oseltamivir acid) were used as an internal standard. Ten microliters of extract samples were injected onto a Chromolith performance RP18e, 100×3 mm analytical column using a Shimadzu LC system operating in a gradient mode.

The chromatographic method involved acetonitrile 0.1% formic acid and H_2O 0.1% formic acid as mobile phases. The gradient ran from 10% to 90% organic phase in 2.5 minutes, and then the 90% organic phase was maintained for 1 minute, returning to initial condition in 0.1 min and up to 6 minutes run time. One milliliter per minute flow rate was used. An API 4000 mass spectrometer (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) with a turboion spray interface operating in positive ionization mode was used for the multiple reaction monitoring analyses.

The analytes were detected by tandem mass spectrometry using the traditional multiple reaction monitoring of precursor-product ion transitions with 100 milliseconds dwell time, at a mass to charge ratio of 313.3/208.1 and 285.2/197.1 for oseltamivir and its corresponding acid and 318.2/203.2 and 289.4/201.2 for $^2\text{H}_5$ -oseltamivir and $^{13}\text{CD}_3$ -oseltamivir acid.

Data acquisition was performed using Analyst 1.4.2. (Applied Biosystems) and the quantification by Watson 7.2.0.03 (Thermo Electro Corp., San Jose, CA). The coefficient of variation for the measurement of Op and Oc at 0.1 ng/mL and 1 (lower limit of quantification) were 6% and 4%, respectively.

Antipyrine concentrations were also measured by high-performance liquid chromatography, with ultraviolet detection at 290 nm. The mobile phase was a mixture of 0.05 mol/L phosphate buffer (pH 3)/methanol/tetrahydrofuran (75/25/0.9 [volume/volume per volume]). Standard curves were prepared with antipyrine concentrations ranging from 50 to 20,000 $\mu\text{g/L}$. Both within-day and between-days variabilities were 10% or

less, and the lower quantification limit of antipyrine was 50 µg/L.

Two transport parameters were assessed during the study and calculated as follows: the fetal transfer rate (FTR) = $(C_f/C_m) \times 100$, where C_f is the venous fetal concentration of drug and C_m is the maternal concentration of the same drug. The result was given as a percentage.

The clearance index (CI) = $FTR(\text{drug})/FTR(\text{Ap})$, where $FTR(\text{drug})$ is the FTR of the studied drug and $FTR(\text{Ap})$ is the FTR of antipyrine.

Descriptive statistics were used and data were expressed as median (range) and mean (\pm SD).

RESULTS

The median age of patients at delivery was 34 years (range, 32–39 years). All the deliveries occurred at term (ie, between 37 and 41 weeks plus 4 days) by vaginal route. Median neonates weights and lengths were normal (3520 g; range, 2580–4510 and 50.5 cm; range, 46–52; respectively).

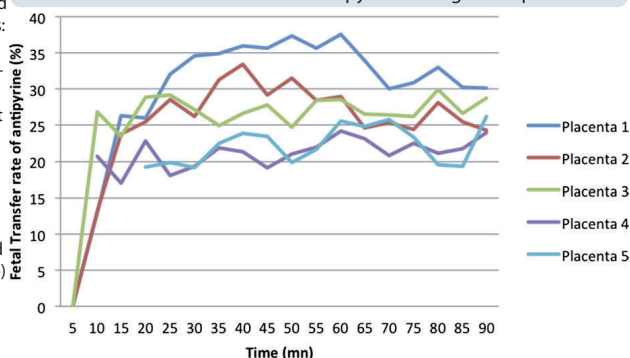
Transplacental transfer of Ap

Evolution of FTR of Ap during the experiment is represented in Figure 1. As expected, there was a plateau from 15 minutes to the end of perfusion. Mean FTR of Ap was 33%, 27%, 27%, 21%, and 22% for each placenta, demonstrating cotyledon integrity and subsequently leading to a validation of each experiment.

Transplacental transfer of Op

Mean maternal concentration of Op from the mean of all 5 experiments was 16.1 ± 1.0 ng/mL. All individual Op maternal concentrations were relatively stable during the experiment. Maximal fetal concentrations reached 2.7 ng/mL and the median fetal concentrations from the mean of all 5 experiments reached 1.4 ng/mL (range, 0.8–2). Evolution of individual values of FTR during the perfusion procedure is represented in Figure 2. As was seen for antipyrine, we observed a plateau from 20 minutes to the end of perfusion. The FTR of Op was ranged from 5.0% and 11.6% with a median FTR of 8.5% (Table). The mean CI of Op was 0.3, with the CI ranging from 0.2 to 0.6.

FIGURE 1
Evolution of fetal transfer rate of antipyrine during the experiment



Berveiller. Transplacental transfer of oseltamivir (Tamiflu) and its metabolite. Am J Obstet Gynecol 2012.

Transplacental transfer of Oc

Mean maternal concentration of Oc was 122.0 ± 7.6 ng/mL. All individual Oc maternal concentrations were relatively stable during the experiment.

Maximal fetal concentrations reached 14.0 ng/mL and median fetal concentrations reached 8.2 ng/mL (range, 5.2–11.6).

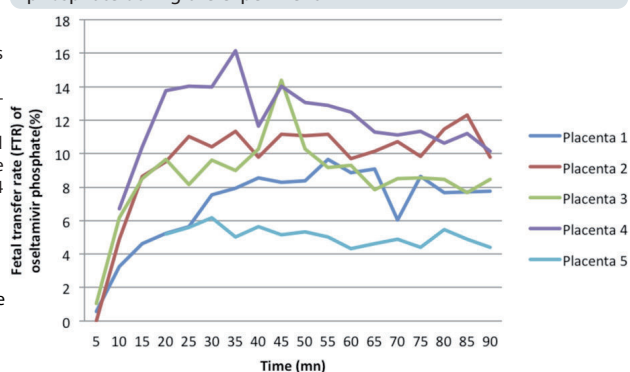
Evolution of FTR of Oc during the perfusion procedure is represented in Figure 3. In the same way, each kinetic of FTR was similar to the corresponding ki-

netic of FTR for Op. Median FTR of Oc was 6.6% (range, 3.9–9.7%) (Table) and median CI was 0.2 with a range of CI comprised between 0.2 and 0.5.

COMMENT

The aim of our study was to investigate transplacental transfer of Op and its active metabolite Oc during the same perfusion procedure. Interestingly, our results did not confirm the previously published data of Worley et al.⁷ Com-

FIGURE 2
Evolution of fetal transfer rate of oseltamivir phosphate during the experiment



Berveiller. Transplacental transfer of oseltamivir (Tamiflu) and its metabolite. Am J Obstet Gynecol 2012.

TABLE
Placental transfers of oseltamivir phosphate and carboxylate

Variable	Oseltamivir phosphate		Oseltamivir carboxylate	
	Median FTR, % (range)	Median CI	Median FTR, % (range)	Median CI
Placenta 1	7.7 (4.6–9.7)	0.2 (0.2–0.3)	6.6 (4.3–8.6)	0.2 (0.2–0.3)
Placenta 2	10.3 (8.6–12.3)	0.4 (0.3–0.5)	8.5 (7.5–10.3)	0.3 (0.3–0.4)
Placenta 3	8.5 (6.2–14.4)	0.3 (0.2–0.5)	6.3 (5.0–10.2)	0.2 (0.2–0.4)
Placenta 4	11.6 (6.7–6.2)	0.6 (0.3–0.8)	9.7 (6.2–11.8)	0.5 (0.3–0.7)
Placenta 5	5.0 (4.3–6.2)	0.2 (0.2–0.3)	3.9 (3.4–4.6)	0.2 (0.1–0.2)
Total median	8.5 (5–11.6)	0.3 (0.2–0.6)	6.6 (3.9–9.7)	0.2 (0.2–0.5)

CI, clearance index; FTR, fetal transfer rate.

Bervellier. Transplacental transfer of oseltamivir (Tamiflu) and its metabolite. *Am J Obstet Gynecol* 2012.

paratively, we found higher transplacental transfer rates for both Op and its metabolite Oc (CI of 0.3; range, 0.2–0.6 and 0.2; range, 0.2–0.5, respectively), although we have used lower Op and Oc concentrations.

Some differences regarding our experimental conditions might explain these contradictory results: first, Worley et al⁷ investigated the transplacental transfer of oseltamivir using an open circuit during 1 hour, and then a close one to specifically study the metabolism of this drug. The authors demonstrated that Op was extensively metabolized in Oc by the placenta and evidenced a potential drug accumulation with high oseltamivir concentrations.

Conversely, in our experiments, we did not investigate the metabolism of Op because we used an open/open circuit during a short period (90 minutes). Indeed, there was no recovery of test substances because these were added once in the maternal at the beginning of the experiment. We investigated only the concentration of test substances in the fetal venous outflow, leading us to determine the transplacental transfer of Op and Oc by determining clearance indexes and fetal transfer rates.

Second, Worley et al⁷ used an albumin concentration of 30 g/L in maternal/fetal compartments, although Op is weakly bound to plasma proteins (42%),

and Oc presents a negligible bound fraction to human albumin (3%).⁹ We chose to use a lower concentration of albumin (2 g/L) to increase the unbound fraction of oseltamivir and thus potentially favor its transfer.

Third, up to 80% of an orally administered dose of Op reaches the systemic circulation as the active metabolite, Oc. Oc is detectable in plasma within 30 minutes following an Op oral dose and reaches maximal concentrations after 3–4 hours.⁹ We therefore aimed to evaluate transplacental transfer of both drugs simultaneously in our experimental conditions, whereas Worley et al⁷ added Op only in the maternal compartment, leading to limited information regarding the placental transfer of Oc.

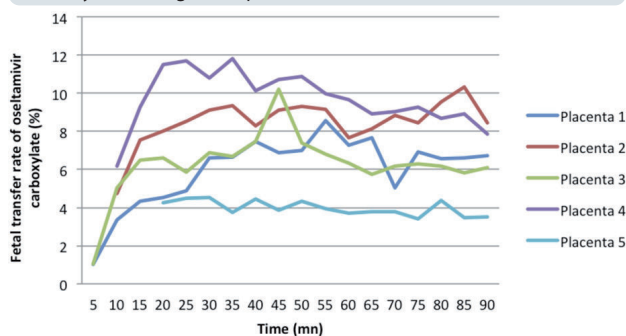
Furthermore, Worley et al⁷ used a unique cotyledon for each experimental condition. In contrast, we evaluated transplacental transfer of Op and Oc in 5 placentas using the identical experimental conditions to decrease experimental variability.²²

Finally, Worley et al¹⁷ used a detection method with a low sensitivity because they did not detect Op or Oc below 30 and 2.4 ng/mL, respectively. In contrast, our detection method was more accurate with sensitivities of 0.1 and 1.3 ng/mL for Op and Oc, respectively. Hence, their detection method might have underestimated the transplacental transfers of Op and Oc.

In addition to these different experimental conditions, our results may be also partially explained by the role of drug transporters. Indeed, specialized transporter proteins take part in drug transport through the biological membranes. These transporters are localized in many biological barriers such as the blood brain barrier, the intestinal barrier, or the placental barrier as well.

In placenta, trophoblast cells being polarized, transporters may be localized in apical surfaces or in basolateral surfaces. Hence, taking into account their localization in the cell, drug transporters can either increase (uptake or influx transporters) or decrease (efflux transporters) the intracellular concentration of a drug.²³ Therefore, fetal net effects

FIGURE 3
Evolution of fetal transfer rate of oseltamivir carboxylate during the experiment



Bervellier. Transplacental transfer of oseltamivir (Tamiflu) and its metabolite. *Am J Obstet Gynecol* 2012.

are determined by the nature and the localization of different transporters as well as physicochemical parameters of the studied drug such as molecular weight, ionization at physiological pH, or lipophilicity.^{24,25}

Several drugs are known to be substrates of the P-glycoprotein (P-gp/ABCB1), multiple drug resistance protein (MRP1-3/ABCC1-3), or breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2), which represent the most studied xenobiotic transporters. Op is known to be a substrate of the efflux transporter P-gp,^{26,27} but Op was also found to be a substrate of the influx transporter PEPT1/SLC15A1.²⁸

Both of these drug transporters are expressed in the placental tissues,^{29,30} P-gp and PEPT1 being highly and weakly expressed, respectively. Despite a high expression of P-gp that could protect fetus from Op, PEPT1 may favor an influx of Op and thereby lead to an unfavorable net transport ratio of Op.

Regarding Oc, it is neither a substrate of the P-gp nor a substrate of the PEPT1.^{27,28} However, Oc is a substrate of efflux transporters OAT1/SLC22A6,³¹ OAT3/SLC22A8, and MRP4/ABCC4,³² and a significant efflux in the blood brain barrier that may subsequently protect the central nervous system was described. Interestingly, these transporters are expressed in the brain but not in placental tissues.²⁴ Hence, transporters involved in the placental transfer of Oc remain to be identified.

In conclusion, the role of drug transporters could partially explain our experimental results showing a significant transplacental transfer of oseltamivir (Op) and its metabolite (Oc) as well.

CONCLUSION

In our study, transplacental transfer of Op and its metabolite Oc was higher than suggested by previous studies. Given the existing concerns regarding the use of oseltamivir in young patients, our data add to the existing knowledge on the potential hazards of using oseltamivir during pregnancy.

Further studies are warranted to establish the complete maternal and fetal safety profiles of oseltamivir. Clinicians

should be encouraged to report complete data on oseltamivir safety in pregnant women and their offspring to better use this drug during pregnancy. f

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to sincerely thank Audrey Chissey, Christelle Simasotchi, Jeanne Bernal Dorange, MSc, and Christelle Gelis, PhD for their important participation in the study.

REFERENCES

1. Moscona A. Neuraminidase inhibitors for influenza. *N Engl J Med* 2005;353:1363-73.
2. Dushoff J, Plotkin JB, Viboud C, Earn DJ, Simonsen L. Mortality due to influenza in the United States—an annualized regression approach using multiple-cause mortality data. *Am J Epidemiol* 2006;163:181-7.
3. Chan M. Influenza A (H1N1). Geneva (Switzerland): World Health Organization; 2009. Available at: www.who.int/mediacentre/news/statements/2009/h1n1_20090429/en/index.html. Accessed May 27, 2009.
4. Centers for Disease Control and Prevention. Pregnant women and novel influenza A (H1N1) considerations for clinicians. Atlanta, GA: Centers for Disease Control and Prevention; 2009. Available at: http://www.cdc.gov/h1n1flu/clinician_pregnant.htm. Accessed May 27, 2009.
5. Fiore AE, Shay DK, Haber P, et al. Prevention and control of influenza. Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP), 2007. *MMWR Recomm Rep* 2007; 56:1-54.
6. Jefferson T, Demicheli V, Rivetti D, Jones M, Di Pietrantonj C, Rivetti A. Antivirals for influenza in healthy adults: systematic review. *Lancet* 2006;367:303-13.
7. MacDonald NE, Riley LE, Steinhoff MC. Influenza immunization in pregnancy. *Obstet Gynecol* 2009;114:365-8.
8. Centers for Disease Control and Prevention. Prevention and control of influenza: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1998;47:1-26.
9. He G, Massarella J, Ward P. Clinical pharmacokinetics of the prodrug oseltamivir and its active metabolite Ro 64-0802. *Clin Pharmacokinet* 1999;37:471-84.
10. Maxwell SR. Tamiflu and neuropsychiatric disturbance in adolescents. *BMJ* 2007;334: 1232-3.
11. Dubar G, Azria E, Tesnière A, et al. French experience of 2009 A/H1N1v influenza in pregnant women. *PLoS One* 2010;5.
12. Centers for Disease Control and Prevention. What pregnant women should know about H1N1 (formerly called swine flu) virus. Atlanta, GA: T Centers for Disease Control and Prevention; 2009. Available at: <http://www.cdc.gov/h1n1flu/guidance/pregnant.htm>. Accessed May 27, 2009.
13. Centers for Disease Control and Prevention. Interim guidance on antiviral recommendations for patients with novel influenza A (H1N1) virus infection and their close contacts. Atlanta, GA: Centers for Disease Control and Prevention; 2009. Available at: www.cdc.gov/h1n1flu/recommendations.htm. Accessed May 17, 2009.
14. Tanaka T, Nakajima K, Murashima A, Garcia-Bourmissen F, Koren G, Ito S. Safety of neuraminidase inhibitors against novel influenza A (H1N1) in pregnant and breastfeeding women. *CMAJ* 2009;181:55-8.
15. Donner B, Niranjan V, Hoffmann G. Safety of oseltamivir in pregnancy: a review of preclinical and clinical data. *Drug Saf*;33:631-42.
16. Nakamura K, Schwartz BS, Lindegardh N, Keh C, Guglielmo BJ. Possible neuropsychiatric reaction to high-dose oseltamivir during acute 2009 H1N1 influenza A infection. *Clin Infect Dis*;50:e47-9.
17. Worley KC, Roberts SW, Bawdon RE. The metabolism and transplacental transfer of oseltamivir in the ex vivo human model. *Infect Dis Obstet Gynecol* 2008;2008:927574.
18. Ariano RE, Sitar DS, Zelenitsky SA, et al. Enteric absorption and pharmacokinetics of oseltamivir in critically ill patients with pandemic (H1N1) influenza. *CMAJ*;182:357-63.
19. Wattanagoon Y, Stepniowska K, Lindegardh N, et al. Pharmacokinetics of high-dose oseltamivir in healthy volunteers. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53:945-52.
20. Schneider H, Panigel M, Dancis J. Transfer across the perfused human placenta of antipyrine, sodium and leucine. *Am J Obstet Gynecol* 1972;114:822-8.
21. Gavard L, Beghin D, Forestier F, et al. Contribution and limit of the model of perfused cotyledon to the study of placental transfer of drugs. Example of a protease inhibitor of HIV: nelfinavir. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2009;147:157-60.
22. Pidoux G, Gerbaud P, Laurendeau I, et al. Large variability of trophoblast gene expression within and between human normal term placentae. *Placenta* 2004;25:469-73.
23. Klaassen CD, Lu H. Xenobiotic transporters: ascribing function from gene knockout and mutation studies. *Toxicol Sci* 2008;101:186-96.
24. Vahakangas K, Myllynen P. Drug transporters in the human blood-placental barrier. *Br J Pharmacol* 2009;158:665-78.
25. Syme MR, Paxton JW, Keelan JA. Drug transfer and metabolism by the human placenta. *Clin Pharmacokinet* 2004;43:487-514.
26. Schinkel AH, Jonker JW. Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview. *Adv Drug Deliv Rev* 2003;55:3-29.
27. Morimoto K, Nakakariya M, Shirasaka Y, et al. Oseltamivir (Tamiflu) efflux transport at the blood-brain barrier via P-glycoprotein. *Drug Metab Dispos* 2008;36:6-9.
28. Ogiwara T, Kano T, Wagatsuma T, et al. Oseltamivir (tamiflu) is a substrate of peptide transporter 1. *Drug Metab Dispos* 2009;37:1676-81.
29. Cordon-Cardo C, O'Brien JP, Boccia J, Casals D, Bertino JR, Melamed MR. Expression

of the multidrug resistance gene product (P-glycoprotein) in human normal and tumor tissues. *J Histochem Cytochem* 1990;38:1277-87.

30. Nishimura M, Naito S. Tissue-specific mRNA expression profiles of human ATP-binding cassette and solute carrier transporter superfamilies. *Drug Metab Pharmacokinet* 2005;20:452-77.
31. Hill G, Cihlar T, Oo C, et al. The anti-influenza drug oseltamivir exhibits low potential to induce pharmacokinetic drug interactions via renal secretion-correlation of in vivo and in vitro studies. *Drug Metab Dispos* 2002;30:13-9.
32. Ose A, Ito M, Kusuvara H, et al. Limited brain distribution of [3R,4R,5S]-4-acetamido-5-amino-3-(1-ethylpropoxy)-1-cyclohexene-1-carboxylate phosphate (Ro 64-0802), a pharmacologically active form of oseltamivir, by active efflux across the blood-brain barrier mediated by organic anion transporter 3 (Oat3/Slc22a8) and multidrug resistance-associated protein 4 (Mrp4/Abcc4). *Drug Metab Dispos* 2009;37:315-21.



A dramatic fetal outcome following transplacental transfer of dasatinib

Paul Berveiller^a, Annalisa Andreoli^f, Olivier Mir^b, Olivia Anselem^c, Anne-Lise Delezoide^d, Hélène Sauvageon^g, Nicolas Chapuis^e and Vassilis Tsatsaris^{a,c}

Chronic myeloid leukemia is a chronic myeloproliferative disorder of hematopoietic stem cells that occurs in 10% of cases in women of childbearing age. Treatment is mainly based on tyrosine kinase inhibitors such as imatinib, dasatinib, or nilotinib. However, the maternal and embryofetal safety of these drugs in pregnant women is poorly documented. Here, we report the case of a 23-year-old woman diagnosed with a chronic myeloid leukemia. She was treated with dasatinib while she was diagnosed as being pregnant at 7 weeks of gestation. Obstetrical monitoring evidenced fetal hydrops associated with severe fetal bicytopenia, leading to termination of pregnancy at 16 weeks of gestation. Dasatinib concentrations were 4 ng/ml in maternal plasma (usual concentration), 3 ng/ml in fetal plasma, and 2 ng/ml in amniotic fluid. Fetal karyotype was normal. To our knowledge, this is the first report clearly quantifying the amount of transplacental transfer of dasatinib. Moreover, fetal hematological toxicity (leukopenia and thrombocytopenia), edema, ascites, and pleural effusions described in this case report are

well-known side effects of dasatinib in adults. Hence, this case highlights the imputability of dasatinib in this adverse outcome, and clearly questions its safety during pregnancy. *Anti-Cancer Drugs* 00:000–000 © 2012 Wolters Kluwer Health | Lippincott Williams & Wilkins.

Anti-Cancer Drugs 2012, 00:000–000

Keywords: chronic myeloid leukemia, dasatinib, placenta, pregnancy neoplastic complications, tyrosine kinase inhibitors

^aPremUp Foundation, INSERM U767, Pharmaceutical and Biological Sciences Faculty, Departments of ^bMedical Oncology, ^cGynecology and Obstetrics, ^dFetopathology, ^eBiological Hematology, Teaching Hospital Cochin – Saint Vincent de Paul, AP-HP, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, ^fDepartment of Haematology and ^gDepartment of Pharmacology and Toxicology, Teaching Hospital Saint Louis, AP-HP, Université Paris 7 – Denis Diderot, Paris, France

AQ1

Correspondence to Paul Berveiller, MD, PremUp Foundation, INSERM U767, Pharmaceutical and Biological Sciences Faculty, Université Paris Descartes, 4, Avenue de l'Observatoire, Sorbonne Paris Cité, F75006 Paris, France
Tel: +33 687 794 653; fax: +33 144 073 992; e-mail: paul.berveiller@inserm.fr

Received 17 January 2012 Revised form accepted 16 February 2012

Introduction

Chronic myeloid leukemia (CML) is a chronic myeloproliferative disorder of hematopoietic stem cells that occurs in 10% of cases in women of childbearing age [1]. Treatment is mainly based on tyrosine kinase inhibitors (TKIs) such as imatinib, dasatinib, or nilotinib [2]. However, the maternal and embryofetal safety of these drugs in pregnant women is poorly documented.

Here, we report the case of a CML patient treated with dasatinib during the first trimester of pregnancy. Obstetrical monitoring evidenced fetal hydrops associated with severe fetal leukopenia and thrombocytopenia, leading to termination of pregnancy. This case highlights the imputability of dasatinib in this adverse outcome, and questions its safety during pregnancy.

Case

A 23-year-old patient, gravida 3 para 2 without significant past history, was referred for visual loss, dizziness, headache, and splenomegaly, revealing CML with a white blood cell count of 479 000/μl (5% blasts), BCR-ABL1 (e13a2) transcript, and a high Hasford score. The patient was started on imatinib at the recommended dose of 400 mg once daily. After 3 months on imatinib, a marked

increase in white blood cells and platelets count suggested early imatinib failure. Blasts were detectable in both peripheral blood (5%) and the bone marrow. The karyotype confirmed the persistence of 100% Philadelphia-positive mitosis, with additional clonal abnormalities. No duplication of the Philadelphia chromosome was found by fluorescence in-situ hybridization. No mutation of the BCR-ABL1 fusion gene was detected. The plasmatic concentration of imatinib was low (26 ng/ml), but the patient had mild emesis for a few days at this time. The diagnosis of imatinib failure was made, and imatinib was therefore switched to dasatinib at the dose of 100 mg once daily.

One month later, the patient complained of headaches, nausea, and abdominal pain. Renal and liver functions as well as the complete blood count (CBC) were normal, suggesting a complete hematological response. Because of persisting nausea, hCG levels were assessed in maternal blood and were found to be positive. An abdominal ultrasonography revealed a single intrauterine pregnancy of 9 weeks of gestation (WG). The patient chose not to interrupt pregnancy despite medical advice. Dasatinib was not discontinued owing to the high-risk features of the patient.

Another ultrasonography was performed at 12 WG, showing a healthy fetus without any detectable malformation. Considering dasatinib exposure, an obstetrical ultrasonography was therefore repeated at 16 WG, and showed a fetal hydrops with subcutaneous edema, pleural effusion, and ascites (Fig. 1a and b). No cardiac or other malformation was detected. The patient was informed of the poor perinatal prognosis, and finally requested a termination of pregnancy.

An amniocentesis was performed to assess dasatinib concentration in amniotic fluid and to analyze the fetal karyotype. Moreover, a fetal blood sampling was also performed to assess CBC and to evaluate the fetal plasmatic concentration of dasatinib. Maternal blood was also collected to evaluate the maternal plasmatic concentration of dasatinib.

Termination of pregnancy was performed at 17 WG, and the patient delivered a eutrophic male fetus weighting 166 g.

Dasatinib concentrations were 4 ng/ml in maternal plasma (usual concentration), 3 ng/ml in fetal plasma, and 2 ng/ml in amniotic fluid. Fetal karyotype was normal. Fetal CBC revealed a severe bicytopenia: 0 leukocytes/ml and 17 000 platelets/ml. Hemoglobin level was normal for gestational age (97 g/l).

Fetopathologic examination revealed a generalized subcutaneous edema, especially in the nuchal and dorsal regions. Dissection revealed pleural effusion and ascites. All organs were examined and no malformation was observed, except for microretrognathia and hypertelorism. No sign of infection or chronic anemia was found. Liver hematopoiesis was found to be rich (Fig. 1c and d shows that the intensity of portal and intrasinusoidal hematopoiesis is comparable in both images) and significantly richer than that in the costal bone marrow, which is normal for gestational age. In addition, no sign of hepatic toxicity was observed.

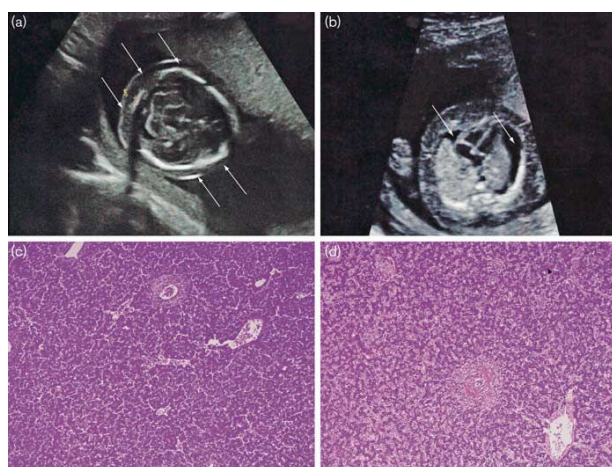
Placental pathologic examination revealed a mild edematous placenta weighing 90 g (normal for gestational age around 120 g).

Six months later, the patient remained in complete hematological response but had no sign of a cytogenetic response. She has been referred for bone marrow transplantation.

Discussion

First-generation TKIs are known to be teratogenic in animal models. Imatinib caused exencephaly, encephalocele, postimplantation losses, stillbirths, and increased neonatal mortality in rats [3]. Expert recommendations suggested that imatinib should be avoided in pregnant

Fig. 1



(a) Ultrasonography image demonstrating subcutaneous edema surrounding the fetal head (white arrows). (b) Ultrasonography image demonstrating pleural effusion (white arrows). (c) Liver histological examination of dasatinib-exposed fetus showing that the intensity of portal and intrasinusoidal hematopoiesis is comparable with hematopoiesis of the age-matched normal fetus (d). (d) Liver histological examination of the age-matched normal fetus.

women, given the occurrence of possible embryotoxicity [4], and the US Food and Drug Administration (FDA) classified imatinib in category D [3]. Pye et al. [5] have reported neonatal abnormalities in 9.6% of patients, including cleft palate, ascites or renal, and vertebral and neurologic malformations. Seventy-five percent of these abnormalities were diagnosed in pregnant patients treated during the first trimester. In 217 pregnancies exposed to imatinib, Cole et al. [6] have evidenced a high rate of complications (33%) including fetal malformations (8% of overall complications).

Second-generation TKIs dasatinib and nilotinib caused embryofetal toxicities in animal models. Dasatinib induced fetal death, microhepatia, edema, skeletal malformations, and reduced ossification [7]. Moreover, significant fetal exposure was evidenced in pregnant rats treated with radiolabeled dasatinib [8]. Thus, dasatinib has been assigned to pregnancy category D by the US FDA [7]. The use of dasatinib in human pregnancy is poorly documented [9–11]. An 18-year-old woman received dasatinib (70 mg daily) until 9 WG [9], followed by hydroxyurea and cytarabine. Obstetrical and fetal monitoring was normal, and the patient delivered a 2.47 kg newborn at 34 WG. Another 18-year-old patient received dasatinib (50 mg daily) until 2 WG, and then switched to interferon. Fetal and obstetrical monitoring was normal as well, and she delivered a 2.1 kg healthy male baby [10].

A series of eight patients receiving dasatinib during pregnancy have also been documented [11]. Among these patients, three requested a termination of pregnancy and another two patients had miscarriages at 8 and 9 WG. Hence, only three full-term pregnancies were reported. Two patients delivered after a short-term exposure to dasatinib (140 mg/day for 7 and 4 weeks, respectively). One of the neonates was considered normal, and the other was hypotrophic without associated abnormality. In the final case, a patient receiving dasatinib at a dose of 100 mg/day for 5 months was found to be pregnant (21 WG). Follow-up of this pregnancy is ongoing. These incomplete data did not evidence any fetal adverse effect, but given the numerous biases and the paucity of information, no firm conclusion can be drawn. Only one case of nilotinib use has been reported in human pregnancy [12]. A 30-year-old CML patient was treated with nilotinib until 7.4 WG. Neither obstetrical complications nor fetal toxicity was observed [12].

Dasatinib is recommended for patients diagnosed with imatinib-resistant CML [13]. In vitro, dasatinib seemed to be 300 times more potent than imatinib in inhibiting BCR-ABL1 tyrosine kinase [14]. Dasatinib has shown considerable efficacy in treatment-naïve CML [15], and its use in CML patients is increasing, thereby increasing the hazards of inadvertent exposure to dasatinib in pregnancy.

In the present case, termination of pregnancy was advised as soon as the pregnancy was diagnosed, but was rejected by the patient. Dasatinib, an FDA category D drug, was therefore maintained throughout the first trimester because of the need to maintain an active treatment against CML. Subsequently, significant fetal abnormalities were detected at 16 WG. We speculate that the fetal abnormalities observed in the present case were triggered by dasatinib. First, the dasatinib concentrations in amniotic fluid and fetal blood were 50 and 75% of the maternal concentrations, respectively, demonstrating a placental transfer of dasatinib, as seen in animal models [8]. Second, hematological toxicity (leukopenia and thrombocytopenia), edema, ascites, and pleural effusions are well-known side effects of dasatinib in adults [13]. These findings are consistent with a toxic origin of the multiple abnormalities found in the fetus. Third, the pregnancy was not at particular risk for an adverse fetal outcome, except for TKIs exposure. Moreover, the patient had given birth to two healthy children 2 and 4 years earlier. She had no personal or family history of fetal loss, and no dysmorphism was noticed in her or her husband's parenthood. There were neither karyotypic abnormalities in the fetus nor placental abnormalities. Taken together, these findings are consistent with a possible toxic effect of dasatinib.

We therefore conclude that dasatinib should be avoided during pregnancy, as it appears to cause hematological toxicity and fetal hydrops. In this case, the imputability of the drug was possible because of complete prenatal assessment including amniocentesis, fetal blood sampling, and fetal autopsy. We believe that prenatal assessment should be as extensive as possible when drugs are suspected to have fetal toxicity or teratogenicity to clearly illustrate their role in these complications. Clinicians should keep in mind that contraception and an hCG test are mandatory before initiating TKIs in women of childbearing age.

Acknowledgements

The authors thank Drs Julia Tantau and Gilles Grange for their participation in this work.

Conflicts of interest

There are no conflicts of interest.

References

1. Cortes J. Natural history and staging of chronic myelogenous leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am* 2004; 18:569–584.
2. Jabbour E, Branford S, Saglio G, Jones D, Cortes JE, Kantarjian HM. Practical advice for determining the role of BCR-ABL mutations in guiding tyrosine kinase inhibitor therapy in patients with chronic myeloid leukemia. *Cancer* 2011; 117:1800–1811.
3. Food and Drug Administration. Available at http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/07/briefing/2007-4325b_08_03_Imatinib_Mesylate_AE_Review.pdf. [Accessed 14 December 2011].
4. Apperley J. Issues of imatinib and pregnancy outcome. *J Natl Compr Canc Netw* 2009; 7:1050–1058.

- 5 Pye SM, Cortes J, Ault P, Hatfield A, Kantarjian H, Pilot R, et al. The effects of imatinib on pregnancy outcome. *Blood* 2008; 111:5505–5508.
- 6 Cole S, Kantarjian H, Ault P, Cortes JE. Successful completion of pregnancy in a patient with chronic myeloid leukemia without active intervention: a case report and review of the literature. *Clin Lymphoma Myeloma* 2009; 9:324–327.
- 7 Food and Drug Administration. Available at http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2010/021986s7s8lbl.pdf. [Accessed 14 December 2011].
- 8 He K, Lago MW, Iyer RA, Shyu WC, Humphreys WG, Christopher LJ. Lactal secretion, fetal and maternal tissue distribution of dasatinib in rats. *Drug Metab Dispos* 2008; 36:2564–2570.
- 9 Kroll T, Ames MB, Pruett JA, Fenske TS. Successful management of pregnancy occurring in a patient with chronic myeloid leukemia on dasatinib. *Leuk Lymphoma* 2010; 51:1751–1753.
- 10 Conchon M, Sanabani SS, Serpa M, Novaes MM, Nardinelli L, Ferreira PB, et al. Successful pregnancy and delivery in a patient with chronic myeloid leukemia while on dasatinib therapy. *Adv Hematol* 2010; doi: 10.1155/2010/136252 [Epub 7 March 2010].
- 11 Cortes J, O'Brien S, Ault P, Borthakur G, Jabbour E, Bradley-Garelik B, et al. Pregnancy outcomes among patients with chronic myeloid leukemia treated with dasatinib. *Blood* 2008; 112:ASH Annual Meeting Abstract 3230.
- 12 Conchon M, Sanabani SS, Bendit I, Santos FM, Serpa M, Dorliac-Llacer PE. Two successful pregnancies in a woman with chronic myeloid leukemia exposed to nilotinib during the first trimester of her second pregnancy: case study. *J Hematol Oncol* 2009; 2:42.
- 13 Hochhaus A, Baccarani M, Deininger M, Apperley JF, Lipton JH, Goldberg SL, et al. Dasatinib induces durable cytogenetic responses in patients with chronic myelogenous leukemia in chronic phase with resistance or intolerance to imatinib. *Leukemia* 2008; 22:1200–1206.
- 14 O'Hare T, Walters DK, Stoffregen EP, Jia T, Manley PW, Mestan J, et al. In vitro activity of Bcr-Abl inhibitors AMN107 and BMS-354825 against clinically relevant imatinib-resistant Abl kinase domain mutants. *Cancer Res* 2005; 65:4500–4505.
- 15 Kantarjian H, Shah NP, Hochhaus A, Cortes J, Shah S, Ayala M, et al. Dasatinib versus imatinib in newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2010; 362:2260–2270.

AQ2

Comment

Increased evidence for use of chemotherapy in pregnancy

The concomitant incidence of breast cancer and pregnancy is rising in high-income countries, because of increases in maternal age at the time of first pregnancy. Chemotherapy has a crucial role in these settings, with clinicians needing to balance embryo and fetal wellbeing with maternal prognosis. So far, only one prospective series¹ has been published of pregnant patients with breast cancer treated with chemotherapy (fluorouracil, doxorubicin, and cyclophosphamide). In *The Lancet Oncology*, Sibylle Loibl and colleagues² report on an international registry which included 197 pregnant women with early breast cancer who received chemotherapy during pregnancy. Compared with those women who were not treated with chemotherapy while pregnant, chemotherapy in utero lowered birthweight, with a slight increase in incidence of premature deliveries and obstetric and neonatal adverse events. Importantly, no major birth defects were noted; therefore, anthracycline-based chemotherapy seems to be feasible in the second and third trimesters of pregnancy, with the level of evidence rising from 3a to 2b.

Despite these findings, the optimum use of cytotoxic drugs in pregnant patients remains undefined, particularly regarding drug selection, dosing, and dose-intensity. First, the assessment of treatment effectiveness in pregnant patients is complex. Data³ suggest that the chemosensitivity of cancers associated with pregnancy seems to resemble that of similar cancers that occur in patients who are not pregnant, and could therefore benefit from taxanes. Although Loibl and colleagues' findings confirm those from previous studies⁴ for the similarities between the safety profiles of epirubicin and doxorubicin, they add little information about taxanes.

Second, the calculation of chemotherapy dose is uncertain in pregnant patients; seemingly, no published data support the use of dosing based on body surface area in this population. Furthermore, whether actual bodyweight or bodyweight before pregnancy should be used to calculate body surface area is unknown. International recommendations⁵ consequently advised the empirical use of actual bodyweight and dosing based on body surface area. Although Loibl and colleagues do not mention such data in their study, further studies should comply with present international recommendations to enable

future comparisons between treatment regimens in terms of activity and tolerability.

Third, from a pharmacological point of view, physiological changes in pregnancy can greatly affect drug disposition. Hence, important changes in albuminaemia and drug volumes of distribution and clearance are noted in the second and third trimesters.⁶ As such, drug exposure after a standard schedule of treatment at recommended doses is expected to be lower in pregnant than non-pregnant patients. Several reports⁷⁻¹¹ of anthracyclines, paclitaxel, cisplatin, and ifosfamide support this hypothesis. Further studies should assess not only toxic effects of chemotherapy regimens in pregnant patients, but also pharmacokinetics. In this context, optimisation of drug exposure during pregnancy would be logical. However, despite that drug exposure seems to be low in pregnant patients, whether doses should be increased in this population is uncertain because such increases could result in severe thrombocytopenia, neutropenia, and infection, with potentially devastating consequences for both mother and baby. Although granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) support can reduce the occurrence of febrile neutropenia in non-pregnant patients, its effectiveness and safety profile during pregnancy are not clearly established.¹⁰ Alternatively, and from a theoretical viewpoint, chemotherapy regimens that are tailored to the pharmacological changes that occur during pregnancy^{10,12} could help to avoid severe haematological toxic effects and use of G-CSF in pregnant patients with cancer.

Finally, few studies,¹³ except for one by the same collaborative network, have assessed long-term outcomes of chemotherapy during pregnancy.

Further clinicopharmacological studies are needed to determine whether the increased fetal risks shown in Loibl and colleagues' study could be minimised with optimised drug selection and dosing. Moreover, the implementation of clinical databases on pregnancy-related cancers, such as those of the Cancer Associated with Pregnancy Network, or the European Society of Gynecological Oncology, is crucial to better handle not only cytotoxic drugs, but also drugs for supportive care in pregnant patients with cancer. Data for long-term outcomes will be derived from these registries in the coming years.



Published Online
August 16, 2012
[http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045\(12\)70331-5](http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045(12)70331-5)
See Online/Articles
[http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045\(12\)70261-9](http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045(12)70261-9)

*Olivier Mir, Paul Berveiller

Cancer Associated with Pregnancy Network, Paris, France (OM, PB); and Department of Medical Oncology, Cochin Teaching Hospital, Université Paris Descartes, 75014 Paris, France (OM) olivier.mir@cch.aphp.fr

OM has been an advisory board member and consultant for Roche, Pfizer, and Servier. PB declares that he has no conflicts of interest.

- 1 Hahn KM, Johnson PH, Gordon N, et al. Treatment of pregnant breast cancer patients and outcomes of children exposed to chemotherapy in utero. *Cancer* 2006; **107**: 1219-26.
- 2 Loibl S, Han S, von Minckwitz G, et al. Treatment of breast cancer during pregnancy: an observational study. *Lancet Oncol* 2012; published online Aug 16. [http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045\(12\)70261-9](http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045(12)70261-9)
- 3 Rouzier R, Werkoff G, Uzan C, et al. Pregnancy-associated breast cancer is as chemosensitive as non-pregnancy-associated breast cancer in the neoadjuvant setting. *Ann Oncol* 2011; **22**: 1582-87.
- 4 Mir O, Berveiller P, Rouzier R, Goffinet F, Goldwasser F, Treluyer JM. Chemotherapy for breast cancer during pregnancy: is epirubicin safe? *Ann Oncol* 2008; **19**: 1814-15.
- 5 Amant F, Deckers S, Van Calsteren K, et al. Breast cancer in pregnancy: recommendations of an international consensus meeting. *Eur J Cancer* 2011; **46**: 3158-68.
- 6 Anderson GD. Pregnancy-induced changes in pharmacokinetics: a mechanistic-based approach. *Clin Pharmacokinet* 2005; **44**: 989-1008.
- 7 Germann N, Goffinet F, Goldwasser F. Anthracyclines during pregnancy: embryo-fetal outcome in 160 patients. *Ann Oncol* 2004; **15**: 146-50.
- 8 Lycette JL, Dul CL, Munar M, et al. Effect of pregnancy on the pharmacokinetics of paclitaxel: a case report. *Clin Breast Cancer* 2006; **7**: 342-44.
- 9 Marmitz S, Kohler C, Oppelt P, et al. Cisplatin application in pregnancy: first in vivo analysis of 7 patients. *Oncology* 2011; **79**: 72-77.
- 10 Mir O, Berrada N, Domont J, et al. Doxorubicin and ifosfamide for high-grade sarcoma during pregnancy. *Cancer Chemother Pharmacol* 2012; **69**: 357-67.
- 11 Van Calsteren K, Verbesselt R, Ottevanger N, et al. Pharmacokinetics of chemotherapeutic agents in pregnancy: a preclinical and clinical study. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2010; **89**: 1338-45.
- 12 Peccatori FA, Azim HA Jr, Scarfone G, et al. Weekly epirubicin in the treatment of gestational breast cancer (GBC). *Breast Cancer Res Treat* 2009; **115**: 591-94.
- 13 Amant F, Van Calsteren K, Halaska MJ, et al. Long-term cognitive and cardiac outcomes after prenatal exposure to chemotherapy in children aged 18 months or older: an observational study. *Lancet Oncol* 2012; **13**: 256-64.

Liste des publications et des communications

Publications internationales depuis 2010

Berveiller P, Carbonne B, Mir O. Cancer and pregnancy : an overview for obstetricians and gynecologists. *Am J Obstet Gynecol*. 2014 Feb 11. [Epub ahead of print]

Amant F, Halaska MJ, Fumagalli M, Dahl Steffensen K, Lok C, Van Calsteren K, Han SN, Mir O, Fruscio R, Uzan C, Maxwell C, Dekrem J, Strauven G, Mhallem Gziri M, Kesic V, **Berveiller P**, van den Heuvel F, Ottevanger PB, Vergote I, Lishner M, Morice P, Nulman I; ESGO task force 'Cancer in Pregnancy'. Gynecologic cancers in pregnancy: guidelines of a second international consensus meeting. *Int J Gynecol Cancer*. 2014 Mar;24(3):394-403.

Berveiller P, Vinot C, Mir O, Broutin S, Deroussent A, Seck A, Camps S, Paci A, Gil S, Treluyer JM. Comparative transfer of taxanes using the human perfused placental cotyledon model. *Am J Obstet Gynecol*. 2012 Dec;207(6):514.e1-514.e7.

Mir O, **Berveiller P**. Increased evidence for use of chemotherapy in pregnancy. *Lancet Oncol*. 2012 Sep;13(9):852-4.

Berveiller P, Mir O. Taxanes during Pregnancy: Probably Safe, but Still to Be Optimized. *Oncology*. 2012 Aug 16;83(4):239-240.

Margulies AL, **Berveiller P**, Mir O, Uzan C, Chabbert-Buffet N, Rouzier R. Pregnancy after breast cancer: an update. *J Gynecol Obstet Biol Reprod*. 2012 Sep;41(5):418-26.

Berveiller P, Andreoli A, Mir O, Anselem O, Delezoïde AL, Sauvageon H, Chapuis N, Tsatsaris V. A dramatic fetal outcome following transplacental transfer of dasatinib. *Anticancer Drugs*. 2012 Aug;23(7):754-7.

Berveiller P, Mir O, Vinot C, Bonati C, Duchene P, Giraud C, Gil S, Treluyer JM. Transplacental transfer of oseltamivir and its metabolite using the human perfused

placental cotyledon model. *Am J Obstet Gynecol*. 2012 Jan;206(1):92.e1-6.

Berveiller P, Veyrie N, Rouzier R, Carbonne B, Mir O. Anti-cancer agents for breast cancer treatment during pregnancy. *J Surg Oncol* 2011 Oct;104(5):560.

Mir O, **Berveiller P**, Serreau R. Using Anti-Cancer Agents during the Post-Partum Period: Not that Simple. *Onkologie* 2010;33(8-9):419.

Communications orales ou posters depuis 2010

International Meeting Cancer and pregnancy / Francfort / 29 Novembre 2013 :

Communication orale : « Cancer and pregnancy : the obstetrician and pharmacologist's perspective »

P. Berveiller

Société Française de Gynécologie-Obstétrique / CNGOF / Paris - Avril 2012:

Communication orale : Grossesse après cancer du sein : mise à jour des connaissances en 2012.

Margulies AL, **Berveiller P**, Mir O, Uzan C, Chabbert-Buffet N, Rouzier R.

Journées Francophones de Recherche en Gynécologie-Obstétrique (JFROG), Paris, 8 Décembre 2011 :

Poster: *Transplacental transfer of oseltamivir and its metabolite using the human perfused placental cotyledon model.*

P. Berveiller, O. Mir, C. Vinot, C. Bonati, P. Duchène, C. Giraud, S. Gil, JM Tréluyer.

**4th workshop PremUp 2011 « Placental Perfusion », Paris, 17-18 Juin 2011
Grenoble, 22-24 Mars 2011.**

Communication orale: Taxanes for treatment of cancer occurring during pregnancy: study of placental transfers of paclitaxel and docetaxel.

P. Berveiller.

**VIème congrès de Physiologie, de pharmacologie et de Thérapeutique (P2T)
Grenoble, 22-24 Mars 2011.**

Poster : Transplacental transfer of oseltamivir and its metabolite using the human perfused placental cotyledon model.

Berveiller P, S. Gil, O. Mir, C. Vinot, A. Chissey, C. Simasotchi, C. Giraud, J. Bernal Dorange, P. Duchêne, J.M. Tréluyer .

Publié dans: **Fundam Clin Pharm** 2011;25 (*Supp.1*): 44-45.

Communication orale: Taxanes for treatment of cancer occurring during pregnancy: study of placental transfers of paclitaxel and docetaxel with the ex vivo perfused human cotyledon model.

Berveiller P, S. Gil, O. Mir, C. Vinot, S. Urien, A. Chissey, C. Simasotchi, V. Tsatsaris, J.M. Tréluyer.

Publié dans: **Fundam Clin Pharm** 2011;25 (*Supp.1*): 36.

IMTCE (Institut Médicament Toxicologie Chimie Environnement) - Paris, Septembre 2010:

Communication orale : Thématique du passage transplacentaire des chimiothérapies.

Berveiller P, Tréluyer JM, Gil S, Evain-Brion D.

Références

- Abele, R., and Tampe, R. (1999). Function of the transport complex TAP in cellular immune recognition. *Biochim Biophys Acta*, **1461** (2), 405-19.
- Abumaree, M.H., Brownbill, P., Burton, G., Castillo, C., Chamley, L., Croy, B.A., Drewlo, S. et al. (2014). IFPA Meeting 2013 Workshop Report III: Maternal placental immunological interactions, novel determinants of trophoblast cell fate, dual ex vivo perfusion of the human placenta. *Placenta*, **35** (S15-9). Epub 2013 Nov 28.
- Aherne, W., and Dunnill, M. S. (1966). Quantitative aspects of placental structure. *J Pathol Bacteriol*, **91** (1), 123-39.
- Ahmadimoghaddam, D., Zemankova, L., Nachtigal, P., Dolezelova, E., Neumanova, Z., Cervený, L., Ceckova, M., Kacerovsky, M., Micuda, S., and Staud, F. (2013). Organic cation transporter 3 (OCT3/SLC22A3) and multidrug and toxin extrusion 1 (MATE1/SLC47A1) transporter in the placenta and fetal tissues: expression profile and fetus protective role at different stages of gestation. *Biol Reprod*, **88** (3), 55.
- Al-Saleh, E., Al-Harmi, J., Nandakumaran, M., and Al-Shammari, M. (2008). Transport kinetics of cisplatin in the perfused human placental lobule in vitro. *J Matern Fetal Neonatal Med*, **21** (10), 726-31.
- Al-Saleh, E., Nandakumaran, M., Al-Rashdan, I., Al-Harmi, J., and Al-Shammari, M. (2007). Maternal-fetal transport kinetics of carboplatin in the perfused human placental lobule: in vitro study. *J Matern Fetal Neonatal Med*, **20** (9), 695-701.
- Amant, F., Brepoels, L., Halaska, M. J., Gziri, M. M., and Calsteren, K. V. (2010). Gynaecologic cancer complicating pregnancy: an overview. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, **24** (1), 61-79.
- Amant, F., Halaska, M. J., Fumagalli, M., Dahl Steffensen, K., Lok, C., Van Calsteren, K., Han, S. N., Mir, O., Fruscio, R., Uzan, C., Maxwell, C., Dekrem, J., Strauven, G., Mhallem Gziri, M., Kesic, V., Berveiller, P., van den Heuvel, F., Ottevanger, P. B., Vergote, I., Lishner, M., Morice, P., Nulman, I., and on behalf of the, E. t. f. c. i. p. (2014). Gynecologic Cancers in Pregnancy: Guidelines of a Second International Consensus Meeting, *Int J Gynecol Cancer*, **24** (3), 394-403.
- Amos, L. A. (2004). Microtubule structure and its stabilisation. *Org Biomol Chem*, **2** (15), 2153-60.
- Andersson, T. M., Johansson, A. L., Hsieh, C. C., Cnattingius, S., and Lambe, M. (2009). Increasing incidence of pregnancy-associated breast cancer in Sweden. *Obstet Gynecol*, **114** (3), 568-72.
- Asheuer, M., Bieche, I., Laurendeau, I., Moser, A., Hainque, B., Vidaud, M., and Aubourg, P. (2005). Decreased expression of ABCD4 and BG1 genes early in the pathogenesis of X-linked adrenoleukodystrophy. *Hum Mol Genet*, **14** (10), 1293-303.
- Atkinson, D. E., Greenwood, S. L., Sibley, C. P., Glazier, J. D., and Fairbairn, L. J. (2003). Role of MDR1 and MRP1 in trophoblast cells, elucidated using retroviral gene transfer. *Am J Physiol Cell Physiol*, **285** (3), C584-91.
- Auner, V., Sehouli, J., Oskay-Oezcelik, G., Horvat, R., Speiser, P., and Zeillinger, R. (2010). ABC transporter gene expression in benign and malignant ovarian tissue. *Gynecol Oncol*, **117** (2), 198-201.
- Babu, E., Takeda, M., Narikawa, S., Kobayashi, Y., Yamamoto, T., Cha, S. H., Sekine, T., Sakthisekaran, D., and Endou, H. (2002). Human organic anion transporters mediate the transport of tetracycline. *Jpn J Pharmacol*, **88** (1), 69-76.
- Badagnani, I., Castro, R. A., Taylor, T. R., Brett, C. M., Huang, C. C., Stryke, D., Kawamoto, M., Johns, S. J., Ferrin, T. E., Carlson, E. J., Burchard, E. G., and Giacomini, K. M. (2006). Interaction of methotrexate with organic-anion transporting polypeptide 1A2 and its genetic variants. *J Pharmacol Exp Ther*, **318** (2), 521-9.
- Baker, S. D., Zhao, M., Lee, C. K., Verweij, J., Zabelina, Y., Brahmer, J. R., Wolff, A. C.,

- Sparreboom, A., and Carducci, M. A. (2004). Comparative pharmacokinetics of weekly and every-three-weeks docetaxel. *Clin Cancer Res*, **10** (6), 1976-83.
- Baldwin, S. A., Beal, P. R., Yao, S. Y., King, A. E., Cass, C. E., and Young, J. D. (2004). The equilibrative nucleoside transporter family, SLC29. *Pflugers Arch*, **447** (5), 735-43.
- Baldwin, S. A., Yao, S. Y., Hyde, R. J., Ng, A. M., Foppolo, S., Barnes, K., Ritzel, M. W., Cass, C. E., and Young, J. D. (2005). Functional characterization of novel human and mouse equilibrative nucleoside transporters (hENT3 and mENT3) located in intracellular membranes. *J Biol Chem*, **280** (16), 15880-7.
- Balkovetz, D. F., Tirupathi, C., Leibach, F. H., Mahesh, V. B., and Ganapathy, V. (1989). Evidence for an imipramine-sensitive serotonin transporter in human placental brush-border membranes. *J Biol Chem*, **264** (4), 2195-8.
- Baloglu, E., and Kingston, D. G. (1999). The taxane diterpenoids. *J Nat Prod*, **62** (10), 1448-72.
- Ban, N., Matsumura, Y., Sakai, H., Takanezawa, Y., Sasaki, M., Arai, H., and Inagaki, N. (2007). ABCA3 as a lipid transporter in pulmonary surfactant biogenesis. *J Biol Chem*, **282** (13), 9628-34.
- Barros, L. F., Yudilevich, D. L., Jarvis, S. M., Beaumont, N., and Baldwin, S. A. (1995). Quantitation and immunolocalization of glucose transporters in the human placenta. *Placenta*, **16** (7), 623-33.
- Barros, L. F., Yudilevich, D. L., Jarvis, S. M., Beaumont, N., Young, J. D., and Baldwin, S. A. (1995). Immunolocalisation of nucleoside transporters in human placental trophoblast and endothelial cells: evidence for multiple transporter isoforms. *Pflugers Arch*, **429** (3), 394-9.
- Baumann, M., Korner, M., Huang, X., Wenger, F., Surbek, D., and Albrecht, C. (2013). Placental ABCA1 and ABCG1 expression in gestational disease: pre-eclampsia affects ABCA1 levels in syncytiotrophoblasts. *Placenta*, **34** (11), 1079-86.
- Baumann, M. U., Deborde, S., and Illsley, N. P. (2002). Placental glucose transfer and fetal growth. *Endocrine*, **19** (1), 13-22.
- Beall, M.H., Wang, S., Yang, B., Chaudhri, N., Amidi, F., Ross, M.G. (2007). Placental and membrane aquaporin water channels: correlation with amniotic fluid volume and composition. *Placenta*, **28** (5-6), 421-8.
- Behravan, J., and Piquette-Miller, M. (2007). Drug transport across the placenta, role of the ABC drug efflux transporters. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, **3** (6), 819-30.
- Berge, K. E., Tian, H., Graf, G. A., Yu, L., Grishin, N. V., Schultz, J., Kwiterovich, P., Shan, B., Barnes, R., and Hobbs, H. H. (2000). Accumulation of dietary cholesterol in sitosterolemia caused by mutations in adjacent ABC transporters. *Science*, **290** (5497), 1771-5.
- Bergen, A. A., Plomp, A. S., Hu, X., de Jong, P. T., and Gorgels, T. G. (2007). ABCC6 and pseudoxanthoma elasticum. *Pflugers Arch*, **453** (5), 685-91.
- Berger, W., Steiner, E., Grusch, M., Elbling, L., and Micksche, M. (2009). Vaults and the major vault protein: novel roles in signal pathway regulation and immunity. *Cell Mol, Life Sci* **66** (1), 43-61.
- Berniske, K. Kaufmann, P. (2000). Early development of the human placenta. In: Berniske, K., Kaufmann, P. eds, New York, Springer-Verlag, 40-49.
- Berveiller, P., and Mir, O. (2012). Taxanes during Pregnancy: Probably Safe, but Still to Be Optimized. *Oncology*, **83** (4), 239-40.
- Berveiller, P., Vinot, C., Mir, O., Broutin, S., Deroussent, A., Seck, A., Camps, S., Paci, A., Gil, S., and Treluyer, J. M. (2012). Comparative transplacental transfer of taxanes using the human perfused cotyledon placental model. *Am J Obstet Gynecol*, **207** (6), 514 e1-14 e7.
- Betz, A. L., and Goldstein, G. W. (1978). Polarity of the blood-brain barrier: neutral amino acid transport into isolated brain capillaries. *Science*, **202** (4364), 225-7.
- Bibee, K. P., Illsley, N. P., and Moley, K. H. (2011). Asymmetric syncytial expression of GLUT9 splice variants in human term placenta and alterations in diabetic pregnancies. *Reprod Sci*, **18** (1), 20-7.

- Bischof, P., and Campana, A. (2000). Molecular mediators of implantation. *Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, **14** (5), 801-14.
- Boado, R. J., Li, J. Y., Nagaya, M., Zhang, C., and Pardridge, W. M. (1999). Selective expression of the large neutral amino acid transporter at the blood-brain barrier. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96** (21), 12079-84.
- Bode, C. J., Jin, H., Rytting, E., Silverstein, P. S., Young, A. M., and Audus, K. L. (2006). In vitro models for studying trophoblast transcellular transport. *Methods Mol Med*, **122**, 225-39.
- Botka, C. W., Wittig, T. W., Graul, R. C., Nielsen, C. U., Higaka, K., Amidon, G. L., and Sadee, W. (2000). Human proton/oligopeptide transporter (POT) genes: identification of putative human genes using bioinformatics. *AAPS PharmSci*, **2** (2), E16.
- Bottalico, B., Larsson, I., Brodzki, J., Hernandez-Andrade, E., Casslen, B., Marsal, K., and Hansson, S. R. (2004). Norepinephrine transporter (NET), serotonin transporter (SERT), vesicular monoamine transporter (VMAT2) and organic cation transporters (OCT1, 2 and EMT) in human placenta from pre-eclamptic and normotensive pregnancies. *Placenta*, **25** (6), 518-29.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, **72**, 248-54.
- Braiterman, L. T., Zheng, S., Watkins, P. A., Geraghty, M. T., Johnson, G., McGuinness, M. C., Moser, A. B., and Smith, K. D. (1998). Suppression of peroxisomal membrane protein defects by peroxisomal ATP binding cassette (ABC) proteins. *Hum Mol Genet*, **7** (2), 239-47.
- Briz, O., Serrano, M. A., Macías, R. I., Gonzalez-Gallego, J., and Marin, J. J. (2003). Role of organic anion-transporting polypeptides, OATP-A, OATP-C and OATP-8, in the human placenta-maternal liver tandem excretory pathway for foetal bilirubin. *Biochem J*, **371** (Pt 3), 897-905.
- Brown, K., Heller, D. S., Zamudio, S., and Illsley, N. P. (2011). Glucose transporter 3 (GLUT3) protein expression in human placenta across gestation. *Placenta*, **32** (12), 1041-9.
- Burckhardt, G. (2012). Drug transport by Organic Anion Transporters (OATs). *Pharmacol Ther*, **136** (1), 106-30.
- Burton, G. J., Woods, A. W., Jauniaux, E., and Kingdom, J. C. (2009). Rheological and physiological consequences of conversion of the maternal spiral arteries for uteroplacental blood flow during human pregnancy. *Placenta*, **30** (6), 473-82.
- Calsteren, K. V., Verbesselt, R., Devlieger, R., De Catte, L., Chai, D. C., Van Bree, R., Heyns, L., Beijnen, J., Demarsin, S., de Bruijn, E., de Hoon, J., and Amant, F. (2010). Transplacental transfer of paclitaxel, docetaxel, carboplatin, and trastuzumab in a baboon model. *Int J Gynecol Cancer*, **20** (9), 1456-64.
- Ceckova-Novotna, M., Pavek, P., and Staud, F. (2006). P-glycoprotein in the placenta: expression, localization, regulation and function. *Reprod Toxicol*, **22** (3), 400-10.
- Cha, S. H., Sekine, T., Kusuhara, H., Yu, E., Kim, J. Y., Kim, D. K., Sugiyama, Y., Kanai, Y., and Endou, H. (2000). Molecular cloning and characterization of multispecific organic anion transporter 4 expressed in the placenta. *J Biol Chem*, **275** (6), 4507-12.
- Champion, E. E., Mann, S. J., Glazier, J. D., Jones, C. J., Rawlings, J. M., Sibley, C. P., and Greenwood, S. L. (2004). System beta and system A amino acid transporters in the feline endotheliochorial placenta. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **287** (6), R1369-79.
- Chan, B. S., Satriano, J. A., Pucci, M., and Schuster, V. L. (1998). Mechanism of prostaglandin E2 transport across the plasma membrane of HeLa cells and *Xenopus* oocytes expressing the prostaglandin transporter "PGT". *J Biol Chem*, **273** (12), 6689-97.
- Chan, S. Y., Franklyn, J. A., Pemberton, H. N., Bulmer, J. N., Visser, T. J., McCabe, C. J., and Kilby, M. D. (2006). Monocarboxylate transporter 8 expression in the human

- placenta: the effects of severe intrauterine growth restriction. *J Endocrinol*, **189** (3), 465-71.
- Chen, S. M., Meng, L. H., and Ding, J. (2010). New microtubule-inhibiting anticancer agents. *Expert Opin Investig Drugs*, **19** (3), 329-43.
- Chevallier, B., Fumoleau, P., Kerbrat, P., Dieras, V., Roche, H., Krakowski, I., Azli, N., Bayssas, M., Lentz, M. A., and Van Glabbeke, M. (1995). Docetaxel is a major cytotoxic drug for the treatment of advanced breast cancer: a phase II trial of the Clinical Screening Cooperative Group of the European Organization for Research and Treatment of Cancer. *J Clin Oncol*, **13** (2), 314-22.
- Clarson, L. H., Glazier, J. D., Sides, M. K., and Sibley, C. P. (1997). Expression of the facilitated glucose transporters (GLUT1 and GLUT3) by a choriocarcinoma cell line (JAR) and cytotrophoblast cells in culture. *Placenta*, **18** (4), 333-9.
- Cleal, J. K., Glazier, J. D., Ntani, G., Crozier, S. R., Day, P. E., Harvey, N. C., Robinson, S. M., Cooper, C., Godfrey, K. M., Hanson, M. A., and Lewis, R. M. (2011). Facilitated transporters mediate net efflux of amino acids to the fetus across the basal membrane of the placental syncytiotrophoblast. *J Physiol*, **589** (Pt 4), 987-97.
- Closs, E. I., Simon, A., Vekony, N., and Rotmann, A. (2004). Plasma membrane transporters for arginine. *J Nutr*, **134** (10 Suppl), 2752S-59S; discussion 65S-67S.
- Cole, S. P., Bhardwaj, G., Gerlach, J. H., Mackie, J. E., Grant, C. E., Almquist, K. C., Stewart, A. J., Kurz, E. U., Duncan, A. M., and Deeley, R. G. (1992). Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science*, **258** (5088), 1650-4.
- Correia Carreira, S., Cartwright, L., Mathiesen, L., Knudsen, L. E., and Saunders, M. (2011). Studying placental transfer of highly purified non-dioxin-like PCBs in two models of the placental barrier. *Placenta*, **32** (3), 283-91.
- Correia, J. J., and Lobert, S. (2001). Physiochemical aspects of tubulin-interacting antimetabolic drugs. *Curr Pharm Des*, **7** (13), 1213-28.
- Crawford, C. R., Patel, D. H., Naeve, C., and Belt, J. A. (1998). Cloning of the human equilibrative, nitrobenzylmercaptapurine riboside (NBMPR)-insensitive nucleoside transporter ei by functional expression in a transport-deficient cell line. *J Biol Chem*, **273** (9), 5288-93.
- Daniel, H., and Kottra, G. (2004). The proton oligopeptide cotransporter family SLC15 in physiology and pharmacology. *Pflugers Arch*, **447** (5), 610-8.
- Dantzig, A. (1997). Oral absorption of beta-lactams by intestinal peptide transport proteins. *Adv Drug Deliv Rev*, **23**, 63-76.
- Dawson, K., Baudequin, M., and O'Riordan, A. (2011). Single on-chip gold nanowires for electrochemical biosensing of glucose. *Analyst*, **136** (21), 4507-13.
- Dean, M., and Annilo, T. (2005). Evolution of the ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily in vertebrates. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, **6**, 123-42.
- Deeley, R. G., Westlake, C., and Cole, S. P. (2006). Transmembrane transport of endo- and xenobiotics by mammalian ATP-binding cassette multidrug resistance proteins. *Physiol Rev*, **86** (3), 849-99.
- del Amo, E. M., Urtti, A., and Yliperttula, M. (2008). Pharmacokinetic role of L-type amino acid transporters LAT1 and LAT2. *Eur J Pharm Sci*, **35** (3), 161-74.
- Demir, R., Kayisli, U. A., Cayli, S., and Huppertz, B. (2006). Sequential steps during vasculogenesis and angiogenesis in the very early human placenta. *Placenta*, **27** (6-7), 535-9.
- Endres, C. J., Moss, A. M., Ke, B., Govindarajan, R., Choi, D. S., Messing, R. O., and Unadkat, J. D. (2009). The role of the equilibrative nucleoside transporter 1 (ENT1) in transport and metabolism of ribavirin by human and wild-type or Ent1^{-/-} mouse erythrocytes. *J Pharmacol Exp Ther*, **329** (1), 387-98.
- Engel, K., Zhou, M., and Wang, J. (2004). Identification and characterization of a novel monoamine transporter in the human brain. *J Biol Chem*, **279** (48), 50042-9.
- Ericsson, A., Hamark, B., Powell, T. L., and Jansson, T. (2005). Glucose transporter isoform

- 4 is expressed in the syncytiotrophoblast of first trimester human placenta. *Hum Reprod*, **20** (2), 521-30.
- Eudy, J. D., Spiegelstein, O., Barber, R. C., Wlodarczyk, B. J., Talbot, J., and Finnell, R. H. (2000). Identification and characterization of the human and mouse SLC19A3 gene: a novel member of the reduced folate family of micronutrient transporter genes. *Mol Genet Metab*, **71** (4), 581-90.
- Evain-Brion, D., and Malassine, A. (2003). Human placenta as an endocrine organ. *Growth Horm IGF Res*, **13 Suppl A**, S34-7.
- Evseenko, D. A., Paxton, J. W., and Keelan, J. A. (2006). ABC drug transporter expression and functional activity in trophoblast-like cell lines and differentiating primary trophoblast. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **290** (5), R1357-65.
- Evseenko, D. A., Paxton, J. W., and Keelan, J. A. (2007). Independent regulation of apical and basolateral drug transporter expression and function in placental trophoblasts by cytokines, steroids, and growth factors. *Drug Metab Dispos*, **35** (4), 595-601.
- Fant, M. E., Yeakley, J., and Harrison, R. W. (1983). Evidence for carrier-mediated transport of glucocorticoids by human placental membrane vesicles. *Biochim Biophys Acta*, **731** (3), 415-20.
- Fisher, S. J., and Damsky, C. H. (1993). Human cytotrophoblast invasion. *Semin Cell Biol*, **4** (3), 183-8.
- Fox, I. H., and Kelley, W. N. (1978). The role of adenosine and 2'-deoxyadenosine in mammalian cells. *Annu Rev Biochem*, **47**, 655-86.
- Fredriksson, R., Nordstrom, K. J., Stephansson, O., Hagglund, M. G., and Schioth, H. B. (2008). The solute carrier (SLC) complement of the human genome: phylogenetic classification reveals four major families. *FEBS Lett*, **582** (27), 3811-6.
- Frendo, J. L., Therond, P., Guibourdenche, J., Bidart, J. M., Vidaud, M., and Evain-Brion, D. (2000). Modulation of copper/zinc superoxide dismutase expression and activity with in vitro differentiation of human villous cytotrophoblasts. *Placenta*, **21** (8), 773-81.
- Fuchs, R., and Ellinger, I. (2004). Endocytic and transcytotic processes in villous syncytiotrophoblast: role in nutrient transport to the human fetus. *Traffic*, **5** (10), 725-38.
- Fujiwara, K., Adachi, H., Nishio, T., Unno, M., Tokui, T., Okabe, M., Onogawa, T., Suzuki, T., Asano, N., Tanemoto, M., Seki, M., Shiiba, K., Suzuki, M., Kondo, Y., Nunoki, K., Shimosegawa, T., Iinuma, K., Ito, S., Matsuno, S., and Abe, T. (2001). Identification of thyroid hormone transporters in humans: different molecules are involved in a tissue-specific manner. *Endocrinology*, **142** (5), 2005-12.
- Gaillard, B., Leng, J. J., Grellet, J., Ducint, D., and Saux, M. C. (1995). [Transplacental passage of epirubicin]. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)*, **24** (1), 63-8.
- Ganapathy, M. E., Brandsch, M., Prasad, P. D., Ganapathy, V., and Leibach, F. H. (1995). Differential recognition of beta -lactam antibiotics by intestinal and renal peptide transporters, PEPT 1 and PEPT 2. *J Biol Chem*, **270** (43), 25672-7.
- Ganapathy, V., Smith, S. B., and Prasad, P. D. (2004). SLC19: the folate/thiamine transporter family. *Pflugers Arch*, **447** (5), 641-6.
- Gao, L., Lv, C., Xu, C., Li, Y., Cui, X., Gu, H., and Ni, X. (2012). Differential regulation of glucose transporters mediated by CRH receptor type 1 and type 2 in human placental trophoblasts. *Endocrinology*, **153** (3), 1464-71.
- Garland, M. (1998). Pharmacology of drug transfer across the placenta. *Obstet Gynecol Clin North Am*, **25** (1), 21-42.
- Gaskin, F., Cantor, C. R., and Shelanski, M. L. (1974). Turbidimetric studies of the in vitro assembly and disassembly of porcine neurotubules. *J Mol Biol*, **89** (4), 737-55.
- Genter, M. B., Krishan, M., Augustine, L. M., and Cherrington, N. J. (2010). Drug transporter expression and localization in rat nasal respiratory and olfactory mucosa and olfactory bulb. *Drug Metab Dispos*, **38** (10), 1644-7.
- Germann, N., Goffinet, F., and Goldwasser, F. (2004). Anthracyclines during pregnancy: embryo-fetal outcome in 160 patients. *Ann Oncol*, **15** (1), 146-50.

- Geyer, J., Doring, B., Meerkamp, K., Ugele, B., Bakhiya, N., Fernandes, C. F., Godoy, J. R., Glatt, H., and Petzinger, E. (2007). Cloning and functional characterization of human sodium-dependent organic anion transporter (SLC10A6). *J Biol Chem*, **282** (27), 19728-41.
- Giacomini, K. M., Huang, S. M., Tweedie, D. J., Benet, L. Z., Brouwer, K. L., Chu, X., Dahlin, A., Evers, R., Fischer, V., Hillgren, K. M., Hoffmaster, K. A., Ishikawa, T., Keppler, D., Kim, R. B., Lee, C. A., Niemi, M., Polli, J. W., Sugiyama, Y., Swaan, P. W., Ware, J. A., Wright, S. H., Yee, S. W., Zamek-Gliszczynski, M. J., and Zhang, L. (2010). Membrane transporters in drug development. *Nat Rev Drug Discov*, **9** (3), 215-36.
- Gil, S., Saura, R., Forestier, F., and Farinotti, R. (2005). P-glycoprotein expression of the human placenta during pregnancy. *Placenta*, **26** (2-3), 268-70.
- Giovannetti, E., Mey, V., Nannizzi, S., Pasqualetti, G., Del Tacca, M., and Danesi, R. (2006). Pharmacogenetics of anticancer drug sensitivity in pancreatic cancer. *Mol Cancer Ther*, **5** (6), 1387-95.
- Glazier, J. D., and Sibley, C. P. (2006). In vitro methods for studying human placental amino acid transport: placental plasma membrane vesicles. *Methods Mol Med*, **122**:241-52.
- Gorboulev, V., Ulzheimer, J. C., Akhoundova, A., Ulzheimer-Teuber, I., Karbach, U., Quester, S., Baumann, C., Lang, F., Busch, A. E., and Koepsell, H. (1997). Cloning and characterization of two human polyspecific organic cation transporters. *DNA Cell Biol*, **16** (7), 871-81.
- Gottesman, M. M., and Pastan, I. (1993). Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annu Rev Biochem*, **62**, 385-427.
- Graham, K. A., Leithoff, J., Coe, I. R., Mowles, D., Mackey, J. R., Young, J. D., and Cass, C. E. (2000). Differential transport of cytosine-containing nucleosides by recombinant human concentrative nucleoside transporter protein hCNT1. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, **19** (1-2), 415-34.
- Gray, J. H., Owen, R. P., and Giacomini, K. M. (2004). The concentrative nucleoside transporter family, SLC28. *Pflugers Arch*, **447** (5), 728-34.
- Grohard, P., Akbaraly, J. P., Saux, M. C., Gimenez, S., Robert, J., Brachet-Liermain, A., and Leng, J. J. (1989). [Transplacental passage of doxorubicin]. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)*, **18** (5), 595-600.
- Grosios, K., Holwell, S. E., McGown, A. T., Pettit, G. R., and Bibby, M. C. (1999). In vivo and in vitro evaluation of combretastatin A-4 and its sodium phosphate prodrug. *Br J Cancer*, **81** (8), 1318-27.
- Grube, M., Meyer Zu Schwabedissen, H., Draber, K., Prager, D., Moritz, K. U., Linnemann, K., Fusch, C., Jedlitschky, G., and Kroemer, H. K. (2005). Expression, localization, and function of the carnitine transporter octn2 (slc22a5) in human placenta. *Drug Metab Dispos*, **33** (1), 31-7.
- Grube, M., Reuther, S., Meyer Zu Schwabedissen, H., Kock, K., Draber, K., Ritter, C. A., Fusch, C., Jedlitschky, G., and Kroemer, H. K. (2007). Organic anion transporting polypeptide 2B1 and breast cancer resistance protein interact in the transepithelial transport of steroid sulfates in human placenta. *Drug Metab Dispos*, **35** (1), 30-5.
- Grundemann, D., Breidert, T., Spitzenberger, F., and Schomig, E. (1998). Molecular structure of the carrier responsible for hepatic uptake of catecholamines. *Adv Pharmacol*, **42**, 346-9.
- Gude, N. M., Stevenson, J. L., Rogers, S., Best, J. D., Kalionis, B., Huisman, M. A., Erwich, J. J., Timmer, A., and King, R. G. (2003). GLUT12 expression in human placenta in first trimester and term. *Placenta*, **24** (5), 566-70.
- Gueritte-Voegelein, F., Guenard, D., Lavelle, F., Le Goff, M. T., Mangatal, L., and Potier, P. (1991). Relationships between the structure of taxol analogues and their antimitotic activity. *J Med Chem*, **34** (3), 992-8.
- Guo, A., Hu, P., Balimane, P. V., Leibach, F. H., and Sinko, P. J. (1999). Interactions of a nonpeptidic drug, valacyclovir, with the human intestinal peptide transporter

- (hPEPT1) expressed in a mammalian cell line. *J Pharmacol Exp Ther*, **289** (1), 448-54.
- Gziri, M. M., Hui, W., Amant, F., Van Calsteren, K., Ottevanger, N., Kapusta, L., and Mertens, L. (2013). Myocardial function in children after fetal chemotherapy exposure. A tissue Doppler and myocardial deformation imaging study. *Eur J Pediatr* **172** (2), 163-70.
- Hache, S., Takser, L., LeBellego, F., Weiler, H., Leduc, L., Forest, J. C., Giguere, Y., Masse, A., Barbeau, B., and Lafond, J. (2011). Alteration of calcium homeostasis in primary preeclamptic syncytiotrophoblasts: effect on calcium exchange in placenta. *J Cell Mol Med*, **15** (3), 654-67.
- Hagenbuch, B. (2007). Cellular entry of thyroid hormones by organic anion transporting polypeptides. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, **21** (2), 209-21.
- Hagenbuch, B., and Gui, C. (2008). Xenobiotic transporters of the human organic anion transporting polypeptides (OATP) family. *Xenobiotica*, **38** (7-8), 778-801.
- Hagenbuch, B., and Meier, P. J. (2003). The superfamily of organic anion transporting polypeptides. *Biochim Biophys Acta*, **1609** (1), 1-18.
- Hagenbuch, B., and Meier, P. J. (2004). Organic anion transporting polypeptides of the OATP/SLC21 family: phylogenetic classification as OATP/SLCO superfamily, new nomenclature and molecular/functional properties. *Pflugers Arch*, **447** (5), 653-65.
- Halestrap, A. P. (2013). The SLC16 gene family - structure, role and regulation in health and disease. *Mol Aspects Med*, **34** (2-3), 337-49.
- Halestrap, A. P., and Meredith, D. (2004). The SLC16 gene family-from monocarboxylate transporters (MCTs) to aromatic amino acid transporters and beyond. *Pflugers Arch*, **447** (5), 619-28.
- Hardman, B., Luff, S., and Ackland, M. L. (2011). Differential intracellular localisation of the Menkes and Wilson copper transporting ATPases in the third trimester human placenta. *Placenta*, **32** (1), 79-85.
- Hardman, B., Manuelpillai, U., Wallace, E. M., Monty, J. F., Kramer, D. R., Kuo, Y. M., Mercer, J. F., and Ackland, M. L. (2006). Expression, localisation and hormone regulation of the human copper transporter hCTR1 in placenta and choriocarcinoma Jeg-3 cells. *Placenta*, **27** (9-10), 968-77.
- Hauguel-de Mouzon, S., Leturque, A., Alsat, E., Loizeau, M., Evain-Brion, D., and Girard, J. (1994). Developmental expression of Glut1 glucose transporter and c-fos genes in human placental cells. *Placenta*, **15** (1), 35-46.
- Heimerl, S., Bosserhoff, A. K., Langmann, T., Ecker, J., and Schmitz, G. (2007). Mapping ATP-binding cassette transporter gene expression profiles in melanocytes and melanoma cells. *Melanoma Res*, **17** (5), 265-73.
- Hemmings, D. G., Lowen, B., Sherburne, R., Sawicki, G., and Guilbert, L. J. (2001). Villous trophoblasts cultured on semi-permeable membranes form an effective barrier to the passage of high and low molecular weight particles. *Placenta*, **22** (1), 70-9.
- Henderson, G. I., Hu, Z. Q., Yang, Y., Perez, T. B., Devi, B. G., Frosto, T. A., and Schenker, S. (1993). Ganciclovir transfer by human placenta and its effects on rat fetal cells. *Am J Med Sci*, **306** (3), 151-6.
- Hennessy, M., and Spiers, J. P. (2007). A primer on the mechanics of P-glycoprotein the multidrug transporter. *Pharmacol Res*, **55** (1), 1-15.
- Herrera-Ruiz, D., and Knipp, G. T. (2003). Current perspectives on established and putative mammalian oligopeptide transporters. *J Pharm Sci*, **92** (4), 691-714.
- Hill, M. D., and Abramson, F. P. (1988). The significance of plasma protein binding on the fetal/maternal distribution of drugs at steady-state. *Clin Pharmacokinet*, **14** (3), 156-70.
- Hirano, M., Maeda, K., Hayashi, H., Kusuhara, H., and Sugiyama, Y. (2005). Bile salt export pump (BSEP/ABCB11) can transport a nonbile acid substrate, pravastatin. *J Pharmacol Exp Ther*, **314** (2), 876-82.

- Hlavata, I., Mohelnikova-Duchonova, B., Vaclavikova, R., Liska, V., Pitule, P., Novak, P., Bruha, J., Vycital, O., Holubec, L., Treska, V., Vodicka, P., and Soucek, P. (2012). The role of ABC transporters in progression and clinical outcome of colorectal cancer. *Mutagenesis*, **27** (2), 187-96.
- Ho, E. A., Soo, P. L., Allen, C., Piquette-Miller, M. (2007). Impact of intraperitoneal, sustained delivery of paclitaxel on the expression of P-glycoprotein in ovarian tumors. *J Control Release*, **117** (1), 20-7.
- Ho, R. H., and Kim, R. B. (2005). Transporters and drug therapy: implications for drug disposition and disease. *Clin Pharmacol Ther*, **78** (3), 260-77.
- Holmes, F. A., Walters, R. S., Theriault, R. L., Forman, A. D., Newton, L. K., Raber, M. N., Buzdar, A. U., Frye, D. K., and Hortobagyi, G. N. (1991). Phase II trial of taxol, an active drug in the treatment of metastatic breast cancer. *J Natl Cancer Inst*, **83** (24), 1797-805.
- Hopper-Borge, E. A., Churchill, T., Paulose, C., Nicolas, E., Jacobs, J. D., Ngo, O., Kuang, Y., Grinberg, A., Westphal, H., Chen, Z. S., Klein-Szanto, A. J., Belinsky, M. G., and Kruh, G. D. (2011). Contribution of Abcc10 (Mrp7) to in vivo paclitaxel resistance as assessed in Abcc10(-/-) mice. *Cancer Res*, **71** (10), 3649-57.
- Horwitz, S. B. (2004). Personal recollections on the early development of taxol. *J Nat Prod*, **67** (2), 136-8.
- Hu, S., Franke, R. M., Filipinski, K. K., Hu, C., Orwick, S. J., de Bruijn, E. A., Burger, H., Baker, S. D., and Sparreboom, A. (2008). Interaction of imatinib with human organic ion carriers. *Clin Cancer Res*, **14** (10), 3141-8.
- Huang, R., Murry, D.J., Kolwankar, D., Hall, S.D., Foster, D.R. (2006). Vincristine transcriptional regulation of efflux transporters in carcinoma cell lines. *Biochem Pharmacol*, **71** (12), 1695-704.
- Huang, Y., Anderle, P., Bussey, K. J., Barbacioru, C., Shankavaram, U., Dai, Z., Reinhold, W. C., Papp, A., Weinstein, J. N., and Sadee, W. (2004). Membrane transporters and channels: role of the transportome in cancer chemosensitivity and chemoresistance. *Cancer Res*, **64** (12), 4294-301.
- Huang, Y., Dai, Z., Barbacioru, C., and Sadee, W. (2005). Cystine-glutamate transporter SLC7A11 in cancer chemosensitivity and chemoresistance. *Cancer Res*, **65** (16), 7446-54.
- Hunter, W. van Riemsdyk, J. (1774). The anatomy of the human gravid uterus. Birmingham
- Hutson, J. R., Garcia-Bournissen, F., Davis, A., and Koren, G. (2011). The human placental perfusion model: a systematic review and development of a model to predict in vivo transfer of therapeutic drugs. *Clin Pharmacol Ther*, **90** (1), 67-76.
- Hyde, R., Taylor, P. M., and Hundal, H. S. (2003). Amino acid transporters: roles in amino acid sensing and signalling in animal cells. *Biochem J*, **373** (Pt 1), 1-18.
- Ieiri, I. (2012). Functional Significance of Genetic Polymorphisms in P-glycoprotein (MDR1, ABCB1) and Breast Cancer Resistance Protein (BCRP, ABCG2). *Drug Metab Pharmacokinet*, **27** (1), 85-105.
- Imanaka, T., Aihara, K., Takano, T., Yamashita, A., Sato, R., Suzuki, Y., Yokota, S., and Osumi, T. (1999). Characterization of the 70-kDa peroxisomal membrane protein, an ATP binding cassette transporter. *J Biol Chem*, **274** (17), 11968-76.
- Ishida, S., Lee, J., Thiele, D. J., and Herskowitz, I. (2002). Uptake of the anticancer drug cisplatin mediated by the copper transporter Ctr1 in yeast and mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99** (22), 14298-302.
- Jacobsson, J. A., Haitina, T., Lindblom, J., and Fredriksson, R. (2007). Identification of six putative human transporters with structural similarity to the drug transporter SLC22 family. *Genomics*, **90** (5), 595-609.
- Jansson, T., Wennergren, M., and Illsley, N. P. (1993). Glucose transporter protein expression in human placenta throughout gestation and in intrauterine growth retardation. *J Clin Endocrinol Metab*, **77** (6), 1554-62.
- Johnson, P. M., Brown, P. J., Ogbimi, A. O., and Shah, L. C. (1981). The human

- syncytiotrophoblast microvillous plasma membrane. *Prog Clin Biol Res* **70**, 77-91.
- Jones, H. N., Ashworth, C. J., Page, K. R., and McArdle, H. J. (2006). Expression and adaptive regulation of amino acid transport system A in a placental cell line under amino acid restriction. *Reproduction*, **131** (5), 951-60.
- Jones, H. N., Jansson, T., and Powell, T. L. (2009). IL-6 stimulates system A amino acid transporter activity in trophoblast cells through STAT3 and increased expression of SNAT2. *Am J Physiol Cell Physiol*, **297** (5), C1228-35.
- Jonker, J. W., and Schinkel, A. H. (2004). Pharmacological and physiological functions of the polyspecific organic cation transporters: OCT1, 2, and 3 (SLC22A1-3). *J Pharmacol Exp Ther*, **308** (1), 2-9.
- Kalliokoski, A., and Niemi, M. (2009). Impact of OATP transporters on pharmacokinetics. *Br J Pharmacol*, **158** (3), 693-705.
- Kanai, N., Lu, R., Satriano, J. A., Bao, Y., Wolkoff, A. W., and Schuster, V. L. (1995). Identification and characterization of a prostaglandin transporter. *Science*, **268** (5212), 866-9.
- Karp, G. I., von Oeyen, P., Valone, F., Khetarpal, V. K., Israel, M., Mayer, R. J., Frigoletto, F. D., and Garnick, M. B. (1983). Doxorubicin in pregnancy: possible transplacental passage. *Cancer Treat Rep* **67** (9), 773-7.
- Kaufmann, P., Mayhew, T. M., and Charnock-Jones, D. S. (2004). Aspects of human fetoplacental vasculogenesis and angiogenesis. II. Changes during normal pregnancy. *Placenta*, **25** (2-3), 114-26.
- Keating, E., Lemos, C., Azevedo, I., and Martel, F. (2006). Characteristics of thiamine uptake by the BeWo human trophoblast cell line. *J Biochem Mol Biol*, **39** (4), 383-93.
- Kekuda, R., Prasad, P. D., Wu, X., Wang, H., Fei, Y. J., Leibach, F. H., and Ganapathy, V. (1998). Cloning and functional characterization of a potential-sensitive, polyspecific organic cation transporter (OCT3) most abundantly expressed in placenta. *J Biol Chem*, **273** (26), 15971-9.
- Kelter, G., Steinbach, D., Konkimalla, V. B., Tahara, T., Taketani, S., Fiebig, H. H., and Efferth, T. (2007). Role of transferrin receptor and the ABC transporters ABCB6 and ABCB7 for resistance and differentiation of tumor cells towards artesunate. *PLoS One*, **2** (8), e798.
- King, A., Thomas, L., and Bischof, P. (2000). Cell culture models of trophoblast II: trophoblast cell lines--a workshop report. *Placenta*, **21 Suppl A**, S113-9.
- Kingston, D. G. (2007). The shape of things to come: structural and synthetic studies of taxol and related compounds. *Phytochemistry*, **68** (14), 1844-54.
- Kinne, A., Kleinau, G., Hoefig, C. S., Gruters, A., Kohrle, J., Krause, G., and Schweizer, U. (2010). Essential molecular determinants for thyroid hormone transport and first structural implications for monocarboxylate transporter 8. *J Biol Chem*, **285** (36), 28054-63.
- Kis, O., Robillard, K., Chan, G. N., and Bendayan, R. (2010). The complexities of antiretroviral drug-drug interactions: role of ABC and SLC transporters. *Trends Pharmacol Sci*, **31** (1), 22-35.
- Klaassen, C. D., and Lu, H. (2008). Xenobiotic transporters: ascribing function from gene knockout and mutation studies. *Toxicol Sci*, **101** (2), 186-96.
- Klein, I., Sarkadi, B., and Varadi, A. (1999). An inventory of the human ABC proteins. *Biochim Biophys Acta*, **1461** (2), 237-62.
- Kliman, H. J., Nestler, J. E., Sermasi, E., Sanger, J. M., and Strauss, J. F., 3rd. (1986). Purification, characterization, and in vitro differentiation of cytotrophoblasts from human term placentae. *Endocrinology*, **118** (4), 1567-82.
- Kobayashi, Y., Ohshiro, N., Sakai, R., Ohbayashi, M., Kohyama, N., and Yamamoto, T. (2005). Transport mechanism and substrate specificity of human organic anion transporter 2 (hOat2 [SLC22A7]). *J Pharm Pharmacol* **57** (5), 573-8.
- Koepsell, H., and Endou, H. (2004). The SLC22 drug transporter family. *Pflugers Arch*, **447** (5), 666-76.

- Korbakis, D. Scorilas, A. (2012). Quantitative expression analysis of the apoptosis-related genes BCL2, BAX and BCL2L12 in gastric adenocarcinoma cells following treatment with the anticancer drugs cisplatin, etoposide and taxol. *Tumour Biol*, **33** (3), 865-75.
- Krauer, B., Dayer, P., and Anner, R. (1984). Changes in serum albumin and alpha 1-acid glycoprotein concentrations during pregnancy: an analysis of fetal-maternal pairs. *Br J Obstet Gynaecol*, **91** (9), 875-81.
- Kruh, G. D., Guo, Y., Hopper-Borge, E., Belinsky, M. G., and Chen, Z. S. (2007). ABCC10, ABCC11, and ABCC12. *Pflugers Arch*, **453** (5), 675-84.
- Kudo, Y., Urabe, T., Fujiwara, A., Yamada, K., and Kawasaki, T. (1989). Carrier-mediated transport system for cephalixin in human placental brush-border membrane vesicles. *Biochim Biophys Acta*, **978** (2), 313-8.
- Kumpel, B. M., and Manoussaka, M. S. (2012). Placental immunology and maternal alloimmune responses. *Vox Sang*, **102** (1), 2-12.
- Kusuhara, H., and Sugiyama, Y. (2005). Active efflux across the blood-brain barrier: role of the solute carrier family. *NeuroRx*, **2** (1), 73-85.
- Lang, T. T., Selner, M., Young, J. D., and Cass, C. E. (2001). Acquisition of human concentrative nucleoside transporter 2 (hcnt2) activity by gene transfer confers sensitivity to fluoropyrimidine nucleosides in drug-resistant leukemia cells. *Mol Pharmacol*, **60** (5), 1143-52.
- Lara, P. C., Pruschy, M., Zimmermann, M., and Henriquez-Hernandez, L. A. (2011). MVP and vaults: a role in the radiation response. *Radiat Oncol*, **6**, 148.
- Lean, C. B., and Lee, E. J. (2009). Genetic variations in the MCT1 (SLC16A1) gene in the Chinese population of Singapore. *Drug Metab Pharmacokinet*, **24** (5), 469-74.
- Lee, Y., Roberts, C., Dobbins, T., Stavrou, E., Black, K., Morris, J., and Young, J. (2012). Incidence and outcomes of pregnancy-associated cancer in Australia, 1994-2008: a population-based linkage study. *BJOG*, **119** (13), 1572-82.
- Leslie, E. M., Deeley, R. G., and Cole, S. P. (2005). Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. *Toxicol Appl Pharmacol*, **204** (3), 216-37.
- Li, M., Anderson, G. D., Phillips, B. R., Kong, W., Shen, D. D., and Wang, J. (2006). Interactions of amoxicillin and cefaclor with human renal organic anion and peptide transporters. *Drug Metab Dispos*, **34** (4), 547-55.
- Liang, R., Fei, Y. J., Prasad, P. D., Ramamoorthy, S., Han, H., Yang-Feng, T. L., Hediger, M. A., Ganapathy, V., and Leibach, F. H. (1995). Human intestinal H⁺/peptide cotransporter. Cloning, functional expression, and chromosomal localization. *J Biol Chem*, **270** (12), 6456-63.
- Loibl, S., Han, S. N., von Minckwitz, G., Bontenbal, M., Ring, A., Giermek, J., Fehm, T., Van Calsteren, K., Linn, S. C., Schlehe, B., Gziri, M. M., Westenend, P. J., Muller, V., Heyns, L., Rack, B., Van Calster, B., Harbeck, N., Lenhard, M., Halaska, M. J., Kaufmann, M., Nekljudova, V., and Amant, F. (2012). Treatment of breast cancer during pregnancy: an observational study. *Lancet Oncol*, **13** (9), 887-96.
- Loibl, S., von Minckwitz, G., Gwyn, K., Ellis, P., Blohmer, J. U., Schlegelberger, B., Keller, M., Harder, S., Theriault, R. L., Crivellari, D., Klingebiel, T., Louwen, F., and Kaufmann, M. (2006). Breast carcinoma during pregnancy. International recommendations from an expert meeting. *Cancer*, **106** (2), 237-46.
- Loubiere, L. S., Vasilopoulou, E., Bulmer, J. N., Taylor, P. M., Stieger, B., Verrey, F., McCabe, C. J., Franklyn, J. A., Kilby, M. D., and Chan, S. Y. (2010). Expression of thyroid hormone transporters in the human placenta and changes associated with intrauterine growth restriction. *Placenta*, **31** (4), 295-304.
- Loubiere, L. S., Vasilopoulou, E., Glazier, J. D., Taylor, P. M., Franklyn, J. A., Kilby, M. D., and Chan, S. Y. (2012). Expression and Function of Thyroid Hormone Transporters in the Microvillous Plasma Membrane of Human Term Placental Syncytiotrophoblast. *Endocrinology*, **153** (12), 6126-35.

- Lycette, J. L., Dul, C. L., Munar, M., Belle, D., Chui, S. Y., Koop, D. R., and Nichols, C. R. (2006). Effect of pregnancy on the pharmacokinetics of paclitaxel: a case report. *Clin Breast Cancer*, **7** (4), 342-4.
- Mack, J. T., Townsend, D. M., Beljanski, V., and Tew, K. D. (2007). The ABCA2 transporter: intracellular roles in trafficking and metabolism of LDL-derived cholesterol and sterol-related compounds. *Curr Drug Metab*, **8** (1), 47-57.
- Mackenzie, B., and Erickson, J. D. (2004). Sodium-coupled neutral amino acid (System N/A) transporters of the SLC38 gene family. *Pflugers Arch*, **447** (5), 784-95.
- Maeda, T., Takahashi, K., Ohtsu, N., Oguma, T., Ohnishi, T., Atsumi, R., and Tamai, I. (2007). Identification of influx transporter for the quinolone antibacterial agent levofloxacin. *Mol Pharm*, **4** (1), 85-94.
- Maliepaard, M., Scheffer, G. L., Faneyte, I. F., van Gastelen, M. A., Pijnenborg, A. C., Schinkel, A. H., van De Vijver, M. J., Scheper, R. J., and Schellens, J. H. (2001). Subcellular localization and distribution of the breast cancer resistance protein transporter in normal human tissues. *Cancer Res*, **61** (8), 3458-64.
- Mando, C., Tabano, S., Pileri, P., Colapietro, P., Marino, M. A., Avagliano, L., Doi, P., Bulfamante, G., Miozzo, M., and Cetin, I. (2013). SNAT2 expression and regulation in human growth-restricted placentas. *Pediatr Res*, **74** (2), 104-10.
- Mani, R. S., Hammond, J. R., Marjan, J. M., Graham, K. A., Young, J. D., Baldwin, S. A., and Cass, C. E. (1998). Demonstration of equilibrative nucleoside transporters (hENT1 and hENT2) in nuclear envelopes of cultured human choriocarcinoma (BeWo) cells by functional reconstitution in proteoliposomes. *J Biol Chem*, **273** (46), 30818-25.
- Marin, J. J., Briz, O., and Serrano, M. A. (2004). A review on the molecular mechanisms involved in the placental barrier for drugs. *Curr Drug Deliv*, **1** (3), 275-89.
- Marnitz, S., Schmitt, A., Bolbrinker, J., Schmidt, F. P., Fons, G., Kalache, K., Schneider, A., and Kohler, C. (2009). The therapeutic management of a twin pregnancy complicated by the presence of cervical cancer, following laparoscopic staging and chemotherapy, with an emphasis on cisplatin concentrations in the fetomaternal compartments amnion fluid, umbilical cord, and maternal serum. *Fertil Steril*, **92** (5), 1748 e1-4.
- Martel, F., and Keating, E. (2003). Uptake of 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP+) by the JAR human placental choriocarcinoma cell line: comparison with 5-hydroxytryptamine. *Placenta*, **24** (4), 361-9.
- Massin, N., Frendo, J. L., Guibourdenche, J., Luton, D., Giovannardi, Y., Muller, F., Vidaud, M., and Evain-Brion, D. (2001). Defect of syncytiotrophoblast formation and human chorionic gonadotropin expression in Down's syndrome. *Placenta*, **22 Suppl A**, S93-7.
- Mathias, A. A., Hitti, J., and Unadkat, J. D. (2005). P-glycoprotein and breast cancer resistance protein expression in human placentae of various gestational ages. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **289** (4), R963-9.
- Mathieu, E., Merviel, P., Barranger, E., Antoine, J. M., and Uzan, S. (2002). [Breast cancer and pregnancy: review of the literature]. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)*, **31** (3), 233-42.
- McGuire, W. P., Rowinsky, E. K., Rosenshein, N. B., Grumbine, F. C., Ettinger, D. S., Armstrong, D. K., and Donehower, R. C. (1989). Taxol: a unique antineoplastic agent with significant activity in advanced ovarian epithelial neoplasms. *Ann Intern Med*, **111** (4), 273-9.
- Merino, G., Jonker, J. W., Wagenaar, E., van Herwaarden, A. E., and Schinkel, A. H. (2005). The breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) affects pharmacokinetics, hepatobiliary excretion, and milk secretion of the antibiotic nitrofurantoin. *Mol Pharmacol*, **67** (5), 1758-64.
- Meyer zu Schwabedissen, H. E., Grube, M., Dreisbach, A., Jedlitschky, G., Meissner, K., Linnemann, K., Fusch, C., Ritter, C. A., Volker, U., and Kroemer, H. K. (2006). Epidermal growth factor-mediated activation of the map kinase cascade

- results in altered expression and function of ABCG2 (BCRP). *Drug Metab Dispos*, **34** (4), 524-33.
- Meyer Zu Schwabedissen, H. E., Grube, M., Heydrich, B., Linnemann, K., Fusch, C., Kroemer, H. K., and Jedlitschky, G. (2005). Expression, localization, and function of MRP5 (ABCC5), a transporter for cyclic nucleotides, in human placenta and cultured human trophoblasts: effects of gestational age and cellular differentiation. *Am J Pathol*, **166** (1), 39-48.
- Meyer zu Schwabedissen, H. E., Jedlitschky, G., Gratz, M., Haenisch, S., Linnemann, K., Fusch, C., Cascorbi, I., and Kroemer, H. K. (2005). Variable expression of MRP2 (ABCC2) in human placenta: influence of gestational age and cellular differentiation. *Drug Metab Dispos*, **33** (7), 896-904.
- Mir, O., and Berveiller, P. (2012). Increased evidence for use of chemotherapy in pregnancy. *Lancet Oncol*, **13** (9), 852-4.
- Mir, O., Berveiller, P., Goffinet, F., Treluyer, J. M., Serreau, R., Goldwasser, F., and Rouzier, R. (2010). Taxanes for breast cancer during pregnancy: a systematic review. *Ann Oncol*, **21** (2), 425-6.
- Mir, O., Berveiller, P., and Pons, G. (2007). Trastuzumab--mechanism of action and use. *N Engl J Med*, **357** (16), 1664-5; author reply 65-6.
- Mir, O., Berveiller, P., Ropert, S., Goffinet, F., Pons, G., Treluyer, J. M., and Goldwasser, F. (2008). Emerging therapeutic options for breast cancer chemotherapy during pregnancy. *Ann Oncol*, **19** (4), 607-13.
- Monte, J. C., Nagle, M. A., Eraly, S. A., and Nigam, S. K. (2004). Identification of a novel murine organic anion transporter family member, OAT6, expressed in olfactory mucosa. *Biochem Biophys Res Commun*, **323** (2), 429-36.
- Moore, W. M., Hellegers, A. E., and Battaglia, F. C. (1966). In vitro permeability of different layers of the human placenta to carbohydrates and urea. *Am J Obstet Gynecol*, **96** (7), 951-5.
- Moss, D. M., Kwan, W. S., Liptrott, N. J., Smith, D. L., Siccardi, M., Khoo, S. H., Back, D. J., and Owen, A. (2011). Raltegravir is a substrate for SLC22A6: a putative mechanism for the interaction between raltegravir and tenofovir. *Antimicrob Agents Chemother*, **55** (2), 879-87.
- Myllynen, P., Mathiesen, L., Weimer, M., Annola, K., Immonen, E., Karttunen, V., Kumm, M., Morck, T. J., Nielsen, J. K., Knudsen, L. E., and Vahakangas, K. (2010). Preliminary interlaboratory comparison of the ex vivo dual human placental perfusion system. *Reprod Toxicol*, **30** (1), 94-102.
- Myllynen, P., and Vahakangas, K. (2013). Placental transfer and metabolism: An overview of the experimental models utilizing human placental tissue. *Toxicol In Vitro*, **27** (1), 507-12.
- Myren, M., Mose, T., Mathiesen, L., and Knudsen, L. E. (2007). The human placenta--an alternative for studying foetal exposure. *Toxicol In Vitro*, **21** (7), 1332-40.
- Nagasawa, K., Nagai, K., Sumitani, Y., Moriya, Y., Muraki, Y., Takara, K., Ohnishi, N., Yokoyama, T., and Fujimoto, S. (2002). Monocarboxylate transporter mediates uptake of lovastatin acid in rat cultured mesangial cells. *J Pharm Sci*, **91** (12), 2605-13.
- Nakamura, E., Sato, M., Yang, H., Miyagawa, F., Harasaki, M., Tomita, K., Matsuoka, S., Noma, A., Iwai, K., and Minato, N. (1999). 4F2 (CD98) heavy chain is associated covalently with an amino acid transporter and controls intracellular trafficking and membrane topology of 4F2 heterodimer. *J Biol Chem*, **274** (5), 3009-16.
- Nakamura, T., Nakanishi, T., Haruta, T., Shirasaka, Y., Keogh, J. P., and Tamai, I. (2010). Transport of ipratropium, an anti-chronic obstructive pulmonary disease drug, is mediated by organic cation/carnitine transporters in human bronchial epithelial cells: implications for carrier-mediated pulmonary absorption. *Mol Pharm*, **7** (1), 187-95.
- Nakanishi, T., Sugawara, M., Huang, W., Martindale, R. G., Leibach, F. H., Ganapathy, M. E., Prasad, P. D., and Ganapathy, V. (2001). Structure, function, and tissue

- expression pattern of human SN2, a subtype of the amino acid transport system N. *Biochem Biophys Res Commun*, **281** (5), 1343-8.
- Nakanishi, T., and Tamai, I. (2011). Solute carrier transporters as targets for drug delivery and pharmacological intervention for chemotherapy. *J Pharm Sci*, **100** (9), 3731-50.
- Nanovskaya, T. N., Nekhayeva, I. A., Hankins, G. D., and Ahmed, M. S. (2008). Transfer of methadone across the dually perfused preterm human placental lobule. *Am J Obstet Gynecol*, **198** (1), 126 e1-4.
- Nanovskaya, T., Nekhayeva, I., Karunaratne, N., Audus, K., Hankins, G.D., Ahmed, M.S. (2005). Role of P-glycoprotein in transplacental transfer of methadone. *Biochem Pharmacol*, **69** (12), 1869-78.
- Nikitina, L., Wenger, F., Baumann, M., Surbek, D., Korner, M., and Albrecht, C. (2011). Expression and localization pattern of ABCA1 in diverse human placental primary cells and tissues. *Placenta*, **32** (6), 420-30.
- Nishimura, M., and Naito, S. (2005). Tissue-specific mRNA expression profiles of human ATP-binding cassette and solute carrier transporter superfamilies. *Drug Metab Pharmacokinet*, **20** (6), 452-77.
- Ogihara, T., Kano, T., Wagatsuma, T., Wada, S., Yabuuchi, H., Enomoto, S., Morimoto, K., Shirasaka, Y., Kobayashi, S., and Tamai, I. (2009). Oseltamivir (tamiflu) is a substrate of peptide transporter 1. *Drug Metab Dispos*, **37** (8), 1676-81.
- Okamoto, Y., Sakata, M., Ogura, K., Yamamoto, T., Yamaguchi, M., Tasaka, K., Kurachi, H., Tsurudome, M., and Murata, Y. (2002). Expression and regulation of 4F2hc and hLAT1 in human trophoblasts. *Am J Physiol Cell Physiol*, **282** (1), C196-204.
- Pacifici, G. M., and Nottoli, R. (1995). Placental transfer of drugs administered to the mother. *Clin Pharmacokinet*, **28** (3), 235-69.
- Palmieri, F. (2013). The mitochondrial transporter family SLC25: identification, properties and physiopathology. *Mol Aspects Med*, **34** (2-3), 465-84.
- Panigel, M. (1962). Placental perfusion experiments. *Am J Obstet Gynecol*, **84**, 19.
- Pardridge, W. M. (1983). Brain metabolism: a perspective from the blood-brain barrier. *Physiol Rev*, **63** (4), 1481-535.
- Park, S. Y., Kim, J. K., Kim, I. J., Choi, B. K., Jung, K. Y., Lee, S., Park, K. J., Chairoungdua, A., Kanai, Y., Endou, H., and Kim, D. K. (2005). Reabsorption of neutral amino acids mediated by amino acid transporter LAT2 and TAT1 in the basolateral membrane of proximal tubule. *Arch Pharm Res*, **28** (4), 421-32.
- Parness, J., and Horwitz, S. B. (1981). Taxol binds to polymerized tubulin in vitro. *J Cell Biol*, **91** (2 Pt 1), 479-87.
- Partanen, H., Vahakangas, K., Woo, C. S., Auriola, S., Veid, J., Chen, Y., Myllynen, P., and El Nezami, H. (2012). Transplacental transfer of melamine. *Placenta*, **33** (1), 60-6.
- Pasanen, M. (1999). The expression and regulation of drug metabolism in human placenta. *Adv Drug Deliv Rev*, **38** (1), 81e97.
- Pascolo, L., Fennetti, C., Pirulli, D., Crovella, S., Amoroso, A., and Tiribelli, C. (2003). Effects of maturation on RNA transcription and protein expression of four MRP genes in human placenta and in BeWo cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **303** (1), 259-65.
- Pastor-Anglada, M., Felipe, A., and Casado, F. J. (1998). Transport and mode of action of nucleoside derivatives used in chemical and antiviral therapies. *Trends Pharmacol Sci*, **19** (10), 424-30.
- Patel, P., Weerasekera, N., Hitchins, M., Boyd, C. A., Johnston, D. G., and Williamson, C. (2003). Semi quantitative expression analysis of MDR3, FIC1, BSEP, OATP-A, OATP-C, OATP-D, OATP-E and NTCP gene transcripts in 1st and 3rd trimester human placenta. *Placenta*, **24** (1), 39-44.
- Patil, S. D., Ngo, L. Y., Glue, P., and Unadkat, J. D. (1998). Intestinal absorption of ribavirin is preferentially mediated by the Na⁺-nucleoside purine (N1) transporter. *Pharm Res*, **15** (6), 950-2.
- Pavek, P., Merino, G., Wagenaar, E., Bolscher, E., Novotna, M., Jonker, J. W., and Schinkel, A. H. (2005). Human breast cancer resistance protein: interactions with

- steroid drugs, hormones, the dietary carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo(4,5-b)pyridine, and transport of cimetidine. *J Pharmacol Exp Ther*, **312** (1), 144-52.
- Pidoux, G., Gerbaud, P., Cocquebert, M., Segond, N., Badet, J., Fournier, T., Guibourdenche, J., and Evain-Brion, D. (2012). Review: Human trophoblast fusion and differentiation: lessons from trisomy 21 placenta. *Placenta*, **33 Suppl**, S81-6.
- Pidoux, G., Gerbaud, P., Marpeau, O., Guibourdenche, J., Ferreira, F., Badet, J., Evain-Brion, D., and Frendo, J. L. (2007). Human placental development is impaired by abnormal human chorionic gonadotropin signaling in trisomy 21 pregnancies. *Endocrinology*, **148** (11), 5403-13.
- Piehlér, A., Kaminski, W. E., Wenzel, J. J., Langmann, T., and Schmitz, G. (2002). Molecular structure of a novel cholesterol-responsive A subclass ABC transporter, ABCA9. *Biochem Biophys Res Commun*, **295** (2), 408-16.
- Pineda, M., Wagner, C. A., Broer, A., Stehberger, P. A., Kaltenbach, S., Gelpi, J. L., Martin Del Rio, R., Zorzano, A., Palacin, M., Lang, F., and Broer, S. (2004). Cystinuria-specific rBAT(R365W) mutation reveals two translocation pathways in the amino acid transporter rBAT-b⁰,+AT. *Biochem J*, **377** (Pt 3), 665-74.
- Prades, C., Arnould, I., Annilo, T., Shulenin, S., Chen, Z. Q., Orosco, L., Triunfol, M., Devaud, C., Maintoux-Larois, C., Lafargue, C., Lemoine, C., Deneffe, P., Rosier, M., and Dean, M. (2002). The human ATP binding cassette gene ABCA13, located on chromosome 7p12.3, encodes a 5058 amino acid protein with an extracellular domain encoded in part by a 4.8-kb conserved exon. *Cytogenet Genome Res*, **98** (2-3), 160-8.
- Pratt, S., Chen, V., Perry, W. I., 3rd, Starling, J. J., and Dantzig, A. H. (2006). Kinetic validation of the use of carboxydichlorofluorescein as a drug surrogate for MRP5-mediated transport. *Eur J Pharm Sci*, **27** (5), 524-32.
- Price, N. T., Jackson, V. N., and Halestrap, A. P. (1998). Cloning and sequencing of four new mammalian monocarboxylate transporter (MCT) homologues confirms the existence of a transporter family with an ancient past. *Biochem J*, **329** (Pt 2), 321-8.
- Procko, E., O'Mara, M. L., Bennett, W. F., Tieleman, D. P., and Gaudet, R. (2009). The mechanism of ABC transporters: general lessons from structural and functional studies of an antigenic peptide transporter. *FASEB J*, **23** (5), 1287-302.
- Prouillac, C., and Lecoeur, S. (2010). The role of the placenta in fetal exposure to xenobiotics: importance of membrane transporters and human models for transfer studies. *Drug Metab Dispos*, **38** (10), 1623-35.
- Prouillac, C., Videmann, B., Mazallon, M., and Lecoeur, S. (2009). Induction of cells differentiation and ABC transporters expression by a myco-estrogen, zearalenone, in human choriocarcinoma cell line (BeWo). *Toxicology*, **263** (2-3), 100-7.
- Ramamoorthy, S., Prasad, P. D., Kulanthaivel, P., Leibach, F. H., Blakely, R. D., and Ganapathy, V. (1993). Expression of a cocaine-sensitive norepinephrine transporter in the human placental syncytiotrophoblast. *Biochemistry*, **32** (5), 1346-53.
- Ramsey, E. M. (1966). Comparison of uteroplacental vasculature and circulation in the rhesus monkey and man. *Contr. Embryol*, **38**, 59-67.
- Redzic, Z. (2011). Molecular biology of the blood-brain and the blood-cerebrospinal fluid barriers: similarities and differences. *Fluids Barriers CNS*, **8** (1), 3.
- Reig, N., Chillaron, J., Bartoccioni, P., Fernandez, E., Bendahan, A., Zorzano, A., Kanner, B., Palacin, M., and Bertran, J. (2002). The light subunit of system b^(o,+) is fully functional in the absence of the heavy subunit. *EMBO J*, **21** (18), 4906-14.
- Reynolds, F., and Knott, C. (1989). Pharmacokinetics in pregnancy and placental drug transfer. *Oxf Rev Reprod Biol*, **11**, 389-449.
- Richards, R. G., Hartman, S. M., and Handwerger, S. (1994). Human cytotrophoblast cells cultured in maternal serum progress to a differentiated syncytial phenotype expressing both human chorionic gonadotropin and human placental lactogen. *Endocrinology*, **135** (1), 321-9.
- Ring, A. E., Smith, I. E., Jones, A., Shannon, C., Galani, E., and Ellis, P. A. (2005).

- Chemotherapy for breast cancer during pregnancy: an 18-year experience from five London teaching hospitals. *J Clin Oncol*, **23** (18), 4192-7.
- Ritzel, M. W., Ng, A. M., Yao, S. Y., Graham, K., Loewen, S. K., Smith, K. M., Ritzel, R. G., Mowles, D. A., Carpenter, P., Chen, X. Z., Karpinski, E., Hyde, R. J., Baldwin, S. A., Cass, C. E., and Young, J. D. (2001). Molecular identification and characterization of novel human and mouse concentrative Na⁺-nucleoside cotransporter proteins (hCNT3 and mCNT3) broadly selective for purine and pyrimidine nucleosides (system cib). *J Biol Chem*, **276** (4), 2914-27.
- Ritzel, M. W., Yao, S. Y., Ng, A. M., Mackey, J. R., Cass, C. E., and Young, J. D. (1998). Molecular cloning, functional expression and chromosomal localization of a cDNA encoding a human Na⁺/nucleoside cotransporter (hCNT2) selective for purine nucleosides and uridine. *Mol Membr Biol*, **15** (4), 203-11.
- Roboz, J., Gleicher, N., Wu, K., Chanihian, P., Kerenyi, T., and Holland, J. (1979). Does doxorubicin cross the placenta? *Lancet* **2** (8156-8157), 1382-3.
- Roby, K. F., Gershon, D., and Hunt, J. S. (1996). Expression of the transporter for antigen processing-1 (Tap-1) Gene in subpopulations of human trophoblast cells. *Placenta*, **17** (1), 27-32.
- Saheki, T., Kobayashi, K., Iijima, M., Nishi, I., Yasuda, T., Yamaguchi, N., Gao, H. Z., Jalil, M. A., Begum, L., and Li, M. X. (2002). Pathogenesis and pathophysiology of citrin (a mitochondrial aspartate glutamate carrier) deficiency. *Metab Brain Dis*, **17** (4), 335-46.
- Saito, J., Hirota, T., Kikunaga, N., Otsubo, K., and Ieiri, I. (2011). Interindividual differences in placental expression of the SLC22A2 (OCT2) gene: relationship to epigenetic variations in the 5'-upstream regulatory region. *J Pharm Sci*, **100** (9), 3875-83.
- Sakata, M., Kurachi, H., Imai, T., Tadokoro, C., Yamaguchi, M., Yoshimoto, Y., Oka, Y., and Miyake, A. (1995). Increase in human placental glucose transporter-1 during pregnancy. *Eur J Endocrinol*, **132** (2), 206-12.
- Santamarina-Fojo, S., Remaley, A. T., Neufeld, E. B., and Brewer, H. B., Jr. (2001). Regulation and intracellular trafficking of the ABCA1 transporter. *J Lipid Res*, **42** (9), 1339-45.
- Sarkadi, B., Ozvegy-Laczka, C., Nemet, K., and Varadi, A. (2004). ABCG2 -- a transporter for all seasons. *FEBS Lett*, **567** (1), 116-20.
- Sata, R., Ohtani, H., Tsujimoto, M., Murakami, H., Koyabu, N., Nakamura, T., Uchiumi, T., Kuwano, M., Nagata, H., Tsukimori, K., Nakano, H., and Sawada, Y. (2005). Functional analysis of organic cation transporter 3 expressed in human placenta. *J Pharmacol Exp Ther*, **315** (2), 888-95.
- Scheepers, A., Schmidt, S., Manolescu, A., Cheeseman, C. I., Bell, A., Zahn, C., Joost, H. G., and Schurmann, A. (2005). Characterization of the human SLC2A11 (GLUT11) gene: alternative promoter usage, function, expression, and subcellular distribution of three isoforms, and lack of mouse orthologue. *Mol Membr Biol*, **22** (4), 339-51.
- Schinkel, A. H., and Jonker, J. W. (2003). Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview. *Adv Drug Deliv Rev*, **55** (1), 3-29.
- Schneider, D., Heilmann, L., and Harenberg, J. (1995). [Placental transfer of low-molecular weight heparin]. *Geburtshilfe Frauenheilkd*, **55** (2), 93-8.
- Schneider, H., Panigel, M., and Dancis, J. (1972). Transfer across the perfused human placenta of antipyrine, sodium and leucine. *Am J Obstet Gynecol*, **114** (6), 822-8.
- Schroeijers, A. B., Scheffer, G. L., Flens, M. J., Meijer, G. A., Izquierdo, M. A., van der Valk, P., and Scheper, R. J. (1998). Immunohistochemical detection of the human major vault protein LRP with two monoclonal antibodies in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Am J Pathol*, **152** (2), 373-8.
- Scotto, K.W. (2003) Transcriptional regulation of ABC drug transporters. *Oncogene*, **22** (47), 7496-511.
- Seeds, A.E. (1968). Placental transfer. In: Barnes AC, editor. *Intrauterine devel@opment*. Philadelphia: Lea & Febiger, 196, 103-28:25.

- Sekine, T., Miyazaki, H., and Endou, H. (2006). Molecular physiology of renal organic anion transporters. *Am J Physiol Renal Physiol*, **290** (2), F251-61.
- Serrano, M. A., Macias, R. I., Briz, O., Monte, M. J., Blazquez, A. G., Williamson, C., Kubitz, R., and Marin, J. J. (2007). Expression in human trophoblast and choriocarcinoma cell lines, BeWo, Jeg-3 and JAr of genes involved in the hepatobiliary-like excretory function of the placenta. *Placenta*, **28** (2-3), 107-17.
- Settle, P., Mynett, K., Speake, P., Champion, E., Doughty, I. M., Sibley, C. P., D'Souza, S. W., and Glazier, J. (2004). Polarized lactate transporter activity and expression in the syncytiotrophoblast of the term human placenta. *Placenta*, **25** (6), 496-504.
- Shah, S. W., Zhao, H., Low, S. Y., McArdle, H. J., and Hundal, H. S. (1999). Characterization of glucose transport and glucose transporters in the human choriocarcinoma cell line, BeWo. *Placenta*, **20** (8), 651-9.
- Shu, C., Shen, H., Hopfer, U., and Smith, D. E. (2001). Mechanism of intestinal absorption and renal reabsorption of an orally active ace inhibitor: uptake and transport of fosinopril in cell cultures. *Drug Metab Dispos*, **29** (10), 1307-15.
- Sissung, T. M., Baum, C. E., Kirkland, C. T., Gao, R., Gardner, E. R., and Figg, W. D. (2010). Pharmacogenetics of membrane transporters: an update on current approaches. *Mol Biotechnol*, **44** (2), 152-67.
- Solanky, N., Requena Jimenez, A., D'Souza, S. W., Sibley, C. P., and Glazier, J. D. (2010). Expression of folate transporters in human placenta and implications for homocysteine metabolism. *Placenta*, **31** (2), 134-43.
- St-Pierre, M. V., Hagenbuch, B., Ugele, B., Meier, P. J., and Stallmach, T. (2002). Characterization of an organic anion-transporting polypeptide (OATP-B) in human placenta. *J Clin Endocrinol Metab*, **87** (4), 1856-63.
- St-Pierre, M. V., Serrano, M. A., Macias, R. I., Dubs, U., Hoechli, M., Lauper, U., Meier, P. J., and Marin, J. J. (2000). Expression of members of the multidrug resistance protein family in human term placenta. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **279** (4), R1495-503.
- Stensheim, H., Moller, B., van Dijk, T., and Fossa, S. D. (2009). Cause-specific survival for women diagnosed with cancer during pregnancy or lactation: a registry-based cohort study. *J Clin Oncol*, **27** (1), 45-51.
- Su, Y., Zhang, X., and Sinko, P. J. (2004). Human organic anion-transporting polypeptide OATP-A (SLC21A3) acts in concert with P-glycoprotein and multidrug resistance protein 2 in the vectorial transport of Saquinavir in Hep G2 cells. *Mol Pharm*, **1** (1), 49-56.
- Sugawara, I., Akiyama, S., Scheper, R. J., and Itoyama, S. (1997). Lung resistance protein (LRP) expression in human normal tissues in comparison with that of MDR1 and MRP. *Cancer Lett*, **112** (1), 23-31.
- Sun, M., Kingdom, J., Baczyk, D., Lye, S. J., Matthews, S. G., and Gibb, W. (2006). Expression of the multidrug resistance P-glycoprotein, (ABCB1 glycoprotein) in the human placenta decreases with advancing gestation. *Placenta*, **27** (6-7), 602-9.
- Syme, M. R., Paxton, J. W., and Keelan, J. A. (2004). Drug transfer and metabolism by the human placenta. *Clin Pharmacokinet*, **43** (8), 487-514.
- Takano, M., Yumoto, R., and Murakami, T. (2006). Expression and function of efflux drug transporters in the intestine. *Pharmacol Ther*, **109** (1-2), 137-61.
- Takeda, M., Babu, E., Narikawa, S., and Endou, H. (2002). Interaction of human organic anion transporters with various cephalosporin antibiotics. *Eur J Pharmacol*, **438** (3), 137-42.
- Takeda, M., Khamdang, S., Narikawa, S., Kimura, H., Kobayashi, Y., Yamamoto, T., Cha, S. H., Sekine, T., and Endou, H. (2002b). Human organic anion transporters and human organic cation transporters mediate renal antiviral transport. *J Pharmacol Exp Ther*, **300** (3), 918-24.
- Tamai, I., Ohashi, R., Nezu, J. I., Sai, Y., Kobayashi, D., Oku, A., Shimane, M., and Tsuji, A. (2000). Molecular and functional characterization of organic cation/carnitine transporter family in mice. *J Biol Chem*, **275** (51), 40064-72.

- Tamai, I., Yabuuchi, H., Nezu, J., Sai, Y., Oku, A., Shimane, M., and Tsuji, A. (1997). Cloning and characterization of a novel human pH-dependent organic cation transporter, OCTN1. *FEBS Lett*, **419** (1), 107-11.
- Tan, B. S., Lonic, A., Morris, M. B., Rathjen, P. D., and Rathjen, J. (2011). The amino acid transporter SNAT2 mediates L-proline-induced differentiation of ES cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, **300** (6), C1270-9.
- Tang, Z., Abrahams, V. M., Mor, G., and Guller, S. (2011). Placental Hofbauer cells and complications of pregnancy. *Ann N Y Acad Sci*, **1221**, 103-8.
- Tani, H., Bandrowski, A. E., Parada, I., Wynn, M., Huguenard, J. R., Prince, D. A., and Reimer, R. J. (2007). Modulation of epileptiform activity by glutamine and system A transport in a model of post-traumatic epilepsy. *Neurobiol Dis*, **25** (2), 230-8.
- Theile, D., Gal, Z., Warta, R. et al. (2014). Antiproliferative efficacies but minor drug transporter inducing effects of paclitaxel, cisplatin, or 5-fluorouracil in a murine xenograft model for head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer biology & therapy*, 15 (4), [Epub ahead of print].
- Thomadaki, H., Scorilas, A. (2008). Molecular profile of breast versus ovarian cancer cells in response to treatment with the anticancer drugs cisplatin, carboplatin, doxorubicin, etoposide and taxol. *Biological chemistry*, **389** (11), 1427-34.
- Thomas, A. C., Tattersall, D., Norgett, E. E., O'Toole, E. A., and Kelsell, D. P. (2009). Premature terminal differentiation and a reduction in specific proteases associated with loss of ABCA12 in Harlequin ichthyosis. *Am J Pathol*, **174** (3), 970-8.
- Torrents, D., Estevez, R., Pineda, M., Fernandez, E., Lloberas, J., Shi, Y. B., Zorzano, A., and Palacin, M. (1998). Identification and characterization of a membrane protein (y+L amino acid transporter-1) that associates with 4F2hc to encode the amino acid transport activity y+L. A candidate gene for lysinuric protein intolerance. *J Biol Chem*, **273** (49), 32437-45.
- Trauner, M., and Boyer, J. L. (2003). Bile salt transporters: molecular characterization, function, and regulation. *Physiol Rev*, **83** (2), 633-71.
- Tsybovsky, Y., Molday, R. S., and Palczewski, K. (2010). The ATP-binding cassette transporter ABCA4: structural and functional properties and role in retinal disease. *Adv Exp Med Biol*, **703**, 105-25.
- Turk, E., and Wright, E. M. (1997). Membrane topology motifs in the SGLT cotransporter family. *J Membr Biol*, **159** (1), 1-20.
- Tyzack, J. K., Wang, X., Belsham, G. J., and Proud, C. G. (2000). ABC50 interacts with eukaryotic initiation factor 2 and associates with the ribosome in an ATP-dependent manner. *J Biol Chem*, **275** (44), 34131-9.
- Ugele, B., St-Pierre, M. V., Pihusch, M., Bahn, A., and Hantschmann, P. (2003). Characterization and identification of steroid sulfate transporters of human placenta. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **284** (2), E390-8.
- Uldry, M., and Thorens, B. (2004). The SLC2 family of facilitated hexose and polyol transporters. *Pflugers Arch*, **447** (5), 480-9.
- Ushigome, F., Koyabu, N., Satoh, S., Tsukimori, K., Nakano, H., Nakamura, T., Uchiumi, T., Kuwano, M., Ohtani, H., and Sawada, Y. (2003). Kinetic analysis of P-glycoprotein-mediated transport by using normal human placental brush-border membrane vesicles. *Pharm Res*, **20** (1), 38-44.
- Ushigome, F., Takanaga, H., Matsuo, H., Yanai, S., Tsukimori, K., Nakano, H., Uchiumi, T., Nakamura, T., Kuwano, M., Ohtani, H., and Sawada, Y. (2000). Human placental transport of vinblastine, vincristine, digoxin and progesterone: contribution of P-glycoprotein. *Eur J Pharmacol*, **408** (1), 1-10.
- Vaclavikova, R., Soucek, P., Svobodova, L., Anzenbacher, P., Simek, P., Guengerich, F. P., and Gut, I. (2004). Different in vitro metabolism of paclitaxel and docetaxel in humans, rats, pigs, and minipigs. *Drug Metab Dispos*, **32** (6), 666-74.
- Vahakangas, K., and Myllynen, P. (2009). Drug transporters in the human blood-placental barrier. *Br J Pharmacol*, **158** (3), 665-78.

- Vahakangas, K., Raunio, H., Pasanen, M., Sivonen, P., Park, S. S., Gelboin, H. V., and Pelkonen, O. (1989). Comparison of the formation of benzo[a]pyrene diolepoxide-DNA adducts in vitro by rat and human microsomes: evidence for the involvement of P-450IA1 and P-450IA2. *J Biochem Toxicol*, **4** (2), 79-86.
- Van Calsteren, K., Heyns, L., De Smet, F., Van Eycken, L., Gziri, M. M., Van Gemert, W., Halaska, M., Vergote, I., Ottevanger, N., and Amant, F. (2010). Cancer during pregnancy: an analysis of 215 patients emphasizing the obstetrical and the neonatal outcomes. *J Clin Oncol*, **28** (4), 683-9.
- Van Calsteren, K., Verbesselt, R., Ottevanger, N., Halaska, M., Heyns, L., Van Bree, R., de Bruijn, E., Chai, D., Delforge, M., Noens, L., Renard, V., Witteveen, E., Rob, L., de Hoon, J., and Amant, F. (2010). Pharmacokinetics of chemotherapeutic agents in pregnancy: a preclinical and clinical study. *Acta Obstet Gynecol Scand*, **89** (10), 1338-45.
- Vasilopoulou, E., Loubiere, L. S., Martin-Santos, A., McCabe, C. J., Franklyn, J. A., Kilby, M. D., and Chan, S. Y. (2010). Differential triiodothyronine responsiveness and transport by human cytotrophoblasts from normal and growth-restricted pregnancies. *J Clin Endocrinol Metab*, **95** (10), 4762-70.
- Vinot, C., Gavard, L., Treluyer, J. M., Manceau, S., Courbon, E., Scherrmann, J. M., Decleves, X., Duro, D., Peytavin, G., Mandelbrot, L., and Giraud, C. (2013). Placental transfer of maraviroc in an ex vivo human cotyledon perfusion model and influence of ABC transporter expression. *Antimicrob Agents Chemother*, **57** (3), 1415-20.
- Wall, A. M., and Rubnitz, J. E. (2003). Pharmacogenomic effects on therapy for acute lymphoblastic leukemia in children. *Pharmacogenomics*, **3** (3), 128-35.
- Wang, J. S., Newport, D. J., Stowe, Z. N., Donovan, J. L., Pennell, P. B., and DeVane, C. L. (2007). The emerging importance of transporter proteins in the psychopharmacological treatment of the pregnant patient. *Drug Metab Rev*, **39** (4), 723-46.
- Wang, Q., and Morris, M. E. (2007). The role of monocarboxylate transporter 2 and 4 in the transport of gamma-hydroxybutyric acid in mammalian cells. *Drug Metab Dispos*, **35** (8), 1393-9.
- Wani, M. C., Taylor, H. L., Wall, M. E., Coggon, P., and McPhail, A. T. (1971). Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *J Am Chem Soc*, **93** (9), 2325-7.
- Watanabe, K., Jinriki, T., and Sato, J. (2004). Effects of progesterone and norethisterone on cephalixin uptake in the human intestinal cell line Caco-2. *Biol Pharm Bull*, **27** (4), 559-63.
- Wilkening, R. B., Battaglia, F. C., and Meschia, G. (1985). The relationship of umbilical glucose uptake to uterine blood flow. *J Dev Physiol*, **7** (5), 313-9.
- Wood, M., and Wood, A. J. (1981). Changes in plasma drug binding and alpha 1-acid glycoprotein in mother and newborn infant. *Clin Pharmacol Ther*, **29** (4), 522-6.
- Wu, X., Kekuda, R., Huang, W., Fei, Y. J., Leibach, F. H., Chen, J., Conway, S. J., and Ganapathy, V. (1998). Identity of the organic cation transporter OCT3 as the extraneuronal monoamine transporter (uptake2) and evidence for the expression of the transporter in the brain. *J Biol Chem*, **273** (49), 32776-86.
- Xu, J., Liu, H., Wu, Y., Gong, X., Zhou, Q., and Qiao, F. (2011). Proapoptotic effect of metalloproteinase 9 secreted by trophoblasts on endothelial cells. *J Obstet Gynaecol Res*, **37** (3), 187-94.
- Yabuuchi, H., Tamai, I., Nezu, J., Sakamoto, K., Oku, A., Shimane, M., Sai, Y., and Tsuji, A. (1999). Novel membrane transporter OCTN1 mediates multispecific, bidirectional, and pH-dependent transport of organic cations. *J Pharmacol Exp Ther*, **289** (2), 768-73.
- Yao, S. Y., Ng, A. M., Sundaram, M., Cass, C. E., Baldwin, S. A., and Young, J. D. (2001). Transport of antiviral 3'-deoxy-nucleoside drugs by recombinant human and rat equilibrative, nitrobenzylthioinosine (NBMPR)-insensitive (ENT2)

- nucleoside transporter proteins produced in *Xenopus* oocytes. *Mol Membr Biol*, **18** (2), 161-7.
- Yasuda, S., Hasui, S., Kobayashi, M., Itagaki, S., Hirano, T., and Iseki, K. (2008). The mechanism of carrier-mediated transport of folates in BeWo cells: the involvement of heme carrier protein 1 in placental folate transport. *Biosci Biotechnol Biochem*, **72** (2), 329-34.
- Yasuda, S., Hasui, S., Yamamoto, C., Yoshioka, C., Kobayashi, M., Itagaki, S., Hirano, T., and Iseki, K. (2008b). Placental folate transport during pregnancy. *Biosci Biotechnol Biochem*, **72** (9), 2277-84.
- Yeboah, D., Sun, M., Kingdom, J., Baczyk, D., Lye, S. J., Matthews, S. G., and Gibb, W. (2006). Expression of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in human placenta throughout gestation and at term before and after labor. *Can J Physiol Pharmacol*, **84** (12), 1251-8.
- Zhang, J., Visser, F., King, K. M., Baldwin, S. A., Young, J. D., and Cass, C. E. (2007). The role of nucleoside transporters in cancer chemotherapy with nucleoside drugs. *Cancer Metastasis Rev*, **26** (1), 85-110.
- Zhou, F., Xu, W., Tanaka, K., and You, G. (2008). Comparison of the interaction of human organic anion transporter hOAT4 with PDZ proteins between kidney cells and placental cells. *Pharm Res*, **25** (2), 475-80.
- Zhu, T., Chen, X. Z., Steel, A., Hediger, M. A., and Smith, D. E. (2000). Differential recognition of ACE inhibitors in *Xenopus laevis* oocytes expressing rat PEPT1 and PEPT2. *Pharm Res*, **17** (5), 526-32.

Cancer du sein pendant la grossesse : Interactions des taxanes avec le trophoblaste humain par une approche *ex vivo* et *in vitro*.

La survenue d'un cancer du sein découvert durant la grossesse est un événement dramatique compliquant entre 1/3000 et 1/10000 grossesses, ce qui en fait le cancer le plus fréquemment rencontré chez la femme enceinte. Sur le plan thérapeutique, certaines molécules anticancéreuses peuvent être utilisées, notamment les taxanes (paclitaxel et docétaxel). Si les études cliniques rétrospectives isolées semblent plutôt rassurantes, les données concernant leur passage transplacentaire sont encore fragmentaires. Quant à leurs effets sur le placenta humain et plus particulièrement sur la fonction de transport placentaire, ils sont pour l'heure inconnus. Nos objectifs étaient de 1) dresser une cartographie de l'expression génique physiologique des différents transporteurs placentaires de médicaments en utilisant un modèle de culture primaire trophoblastique, 2) d'apprécier le passage transplacentaire comparatif des taxanes et leur accumulation placentaire en utilisant le modèle du cotylédon perfusé, 3) d'étudier plus particulièrement les effets du paclitaxel sur le placenta humain et notamment sur l'expression des transporteurs de médicaments, en utilisant en plus des modèles mentionnés, les cotylédons de patientes ayant été traitées par paclitaxel durant leur grossesse. Nos études ont tout d'abord permis de dresser une cartographie originale de l'expression physiologique de plus de 80 transporteurs placentaires de médicaments, et ce comparativement entre le début et la fin de la gestation. De plus, nos expériences ont montré que le passage transplacentaire des taxanes était faible et comparable entre les deux molécules, et que celles-ci semblaient s'accumuler dans les cotylédons placentaires. Enfin, nous avons pu mettre en évidence un effet significatif du paclitaxel sur le placenta humain, notamment sur la modulation de certains transporteurs de médicaments.

Mots-clés : cancer; grossesse; placenta ; taxanes; paclitaxel; docétaxel; transporteurs de médicaments; culture primaire de trophoblastes.

Breast cancer during pregnancy: taxanes interactions with human trophoblast using *ex vivo* and *in vitro* models.

The occurrence of breast cancer during pregnancy is a dramatic event reaching roughly 1/3000 to 1/10000 pregnancies, this type of cancer being the most frequent in pregnant women. Regarding therapeutic options, some anticancer agents may be used, especially taxanes (paclitaxel and docetaxel). If most of retrospective data appear to be reassuring, little is known regarding their transplacental transfer. Moreover, to our knowledge, potential effects of taxanes on human placenta, especially on placental transport function are unknown. Our aims were to 1) provide a transcriptional expression cartography of various placental drug transporters throughout pregnancy, using primary trophoblast culture model, 2) assess the comparative transplacental transfer of taxanes and their accumulation in cotyledons, using the perfused placental model, 3) assess potential effects of paclitaxel on human placenta, especially on drug transporter expression, not only using above-described models, but also cotyledons from pregnant-cancer patients treated with paclitaxel during pregnancy. Here, we finally provided an original transcriptional cartography of various drugs transporters in human normal placenta all along pregnancy. Moreover, we found a low and comparable transplacental transfer of paclitaxel and docetaxel that led to a moderate accumulation in cotyledons. Finally, we evidenced a significant effect of paclitaxel on human placenta, especially by modulating drug transporter expression.

Key-words: cancer; pregnancy; placenta; taxanes; paclitaxel; docetaxel; drug transporters; primary trophoblast cultures.
